

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT

## NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 10 March 2000 (10.03.00)	
International application No. PCT/EP99/05523	Applicant's or agent's file reference 1998/M224NP
International filing date (day/month/year) 30 July 1999 (30.07.99)	Priority date (day/month/year) 31 July 1998 (31.07.98)
Applicant FROHBERG, Claus	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

29 January 2000 (29.01.00)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was  
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer Claudio Borton Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Eing. 16. Aug. 2000

PCT

☐ WW☐ ablegen☐ Vert. wie Vorg. / angeleg.NOTIFICATION OF THE RECORDING  
OF A CHANGE(PCT Rule 92bis.1 and  
Administrative Instructions, Section 422)

## PATENT COOPERATION TREATY

PCT/EP99/05523

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung,  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNEDate of mailing (day/month/year)  
08 August 2000 (08.08.00)Applicant's or agent's file reference  
1998/M224NPInternational application No.  
PCT/EP99/05523International filing date (day/month/year)  
30 July 1999 (30.07.99)

## IMPORTANT NOTIFICATION

## 1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

## Name and Address

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Mirastrasse 54  
D-13509 Berlin  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069-305-82808

## Facsimile No.

## Teleprinter No.

069-305-2200

## 2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

## Name and Address

AVENTIS CROPSCIENCE GMBH  
Brünigstrasse 50  
D-65929 Frankfurt  
Germany

## State of Nationality

DE

## State of Residence

DE

## Telephone No.

069 305 7427

## Facsimile No.

069 305 2200

## Teleprinter No.

## 3. Further observations, if necessary:

## 4. A copy of this notification has been sent to:

☒ the receiving Office ☐ the designated Offices concerned  
☐ the International Searching Authority ☒ the elected Offices concerned  
☒ the International Preliminary Examining Authority ☐ other:The International Bureau of WIPO  
34, chemin des Colombettes  
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

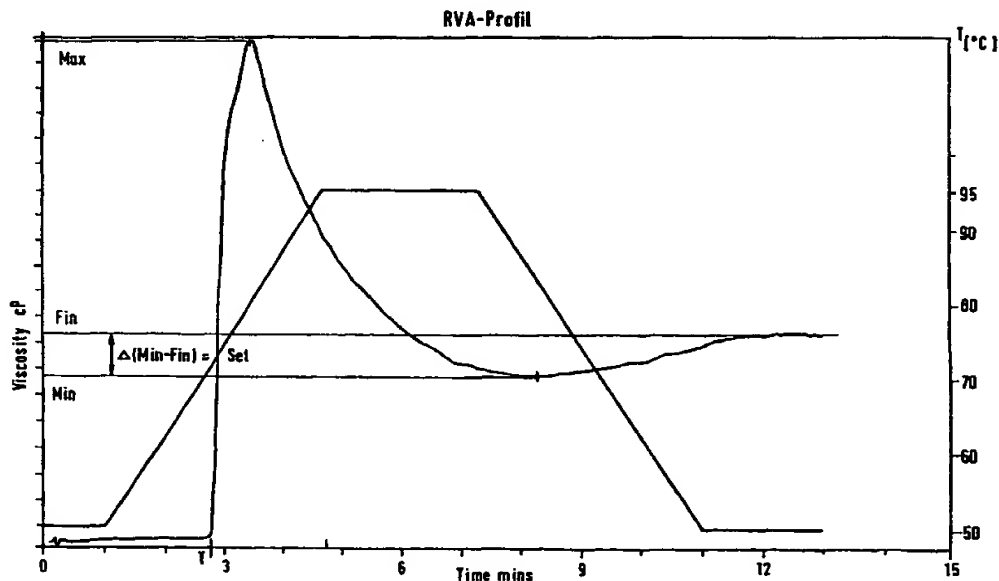
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<b>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :</b> <b>C12N 15/82, 9/26, 15/54, A01H 5/00,</b> <b>C08B 30/00</b>		<b>A1</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/08185</b>
		<b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b>	17. Februar 2000 (17.02.00)
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/EP99/05523		<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
<b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 30. Juli 1999 (30.07.99)			
<b>(30) Prioritätsdaten:</b> 198 36 099.1      31. Juli 1998 (31.07.98)      DE			
<b>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US):</b> HOECHST SCHERING AGREVO GMBH [DE/DE]; Mirastrasse 54, D-13509 Berlin (DE).			
<b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> FROHBERG, Claus [DE/DE]; Blankenhainer Strasse 17, D-12249 Berlin (DE).		<b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	

**(54) Title:** NUCLEIC ACID MOLECULE CODING FOR BETA-AMYLASE, PLANTS SYNTHESIZING A MODIFIED STARCH, METHOD OF PRODUCTION AND APPLICATIONS**(54) Bezeichnung:** NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE KODIEREND FÜR BETA-AMYLASE, PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNGEN**(57) Abstract**

The present invention relates to nucleic acid molecules coding for a protein with beta-amylase activity from potato and to a method for the production of transgenic plant cells and plants synthesizing a modified starch. The invention also relates to vectors and host cells containing the nucleic acid molecules according to the invention, the plant cells and plants produced using the method according to the invention and the starch synthesized by the plant cells and plants according to the invention. The invention also relates to a method of production of said starch.



### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel kodieren sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Des weiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**NUKLEINSÄUREMOLEKÜLE KODIEREND FÜR BETA-AMYLASE, PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE STÄRKE SYNTHETISIEREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNGEN**

Die vorliegende Erfindung betrifft Nukleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der Aktivität einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel kodieren sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren. Desweiteren betrifft die vorliegende Erfindung Vektoren und Wirtszellen, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten, die aus den erfindungsgemäßen Verfahren hervorgehenden Pflanzenzellen und Pflanzen, die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke sowie Verfahren zur Herstellung dieser Stärke.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen beigemessen wird, ist die biotechnologische Forschung um eine Anpassung pflanzlicher Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie bemüht. Um die Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es insofern erforderlich, eine große Stoffvielfalt zur Verfügung zu stellen.

Neben Ölen, Fetten und Proteinen stellen Polysaccharide wichtige, nachwachsende Rohstoffe aus Pflanzen dar. Eine zentrale Stellung bei den Polysacchariden nimmt neben Cellulose die Stärke ein, die einer der wichtigsten Speicherstoffe in höheren Pflanzen ist. Neben Mais, Reis und Weizen spielt die Kartoffel insbesondere bei der Stärkeproduktion eine wichtige Rolle.

Das Polysaccharid Stärke ist ein Polymer aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glukosemolekülen. Es handelt sich dabei jedoch um ein sehr komplexes Gemisch aus unterschiedlichen Molekülformen, die sich hinsichtlich ihres Polymerisationsgrades

B E S T Ä T I G U N G S K O P I E

und des Auftretens von Verzweigungen der Glukoseketten unterscheiden. Daher stellt Stärke keinen einheitlichen Rohstoff dar. Man unterscheidet insbesondere die Amylose-Stärke, ein im wesentlichen unverzweigtes Polymer aus  $\alpha$ -1,4-glykosidisch verknüpften Glukosemolekülen, von der Amylopektin-Stärke, die ihrerseits ein komplexes Gemisch aus unterschiedlich verzweigten Glukoseketten darstellt. Die Verzweigungen kommen dabei durch das Auftreten von zusätzlichen  $\alpha$ -1,6-glykosidischen Verknüpfungen zustande. In typischen für die Stärkeproduktion verwendeten Pflanzen, wie z.B. Mais oder Kartoffel, besteht die synthetisierte Stärke zu ca. 25% aus Amylosestärke und zu ca. 75% aus Amylopektin-Stärke.

Die molekulare Struktur der Stärke, die zu einem großen Teil durch den Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten sowie das Vorhandensein von Phosphatgruppen bestimmt wird, ist ausschlaggebend für wichtige funktionelle Eigenschaften der Stärke bzw. ihrer wäßrigen Lösungen. Als wichtige funktionelle Eigenschaften sind hierbei beispielsweise zu nennen, die Löslichkeit, das Retrogradierungsverhalten, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Farbstabilität, die Verkleisterungseigenschaften sowie Binde- und Klebeeigenschaften. Auch die Stärkekorngröße kann für verschiedene Anwendungen von Bedeutung sein. Für bestimmte Anwendungen ist auch die Erzeugung von hochamylosehaltigen Stärken von besonderem Interesse. Ferner kann eine in Pflanzenzellen enthaltene modifizierte Stärke das Verhalten der Pflanzenzelle unter bestimmten Bedingungen vorteilhaft verändern. Denkbar ist beispielsweise eine Verringerung des Stärkeabbaus während der Lagerung von Stärke-enhaltenden Organen, wie z.B. Samen oder Knollen, vor deren weiterer Verarbeitung, z.B. zur Extraktion der Stärke. Ferner ist es von Interesse, modifizierte Stärken herzustellen, die dazu führen, daß Pflanzenzellen oder pflanzliche Organe, die diese Stärke enthalten, besser zur Weiterverarbeitung geeignet sind, beispielsweise bei der Herstellung von Lebensmitteln wie "Popcorn" oder "Cornflakes" aus Mais oder von Pommes frites, Chips oder Kartoffelpulver aus Kartoffeln. Von besonderem Interesse ist hierbei die Verbesserung der Stärken in der Hinsicht, daß sie ein reduziert s "cold sweetening" aufweisen, d.h. eine verringerte Freisetzung von reduzierenden Zuckern



(insbesondere Glucose) bei einer längeren Lagerung bei niedrigen Temperaturen. Gerade Kartoffeln werden häufig bei Temperaturen von 4 bis 8°C gelagert, um den Stärkeabbau während der Lagerung zu minimieren. Die hierbei freigesetzten reduzierenden Zucker, insbesondere Glucose, führen beispielsweise bei der Herstellung von Pommes frites oder Chips zu unerwünschten Bräunungsreaktionen (sogenannte Maillard-Reaktionen).

Die Anpassung der aus Pflanzen isolierbaren Stärke an bestimmte industrielle Verwendungszwecke erfolgt häufig mit Hilfe chemischer Modifikationen, die in der Regel zeit- und kostenintensiv sind. Es erscheint daher wünschenswert, Möglichkeiten zu finden, Pflanzen herzustellen, die eine Stärke synthetisieren, die in ihren Eigenschaften bereits den spezifischen Anforderungen der verarbeitenden Industrie entsprechen und somit ökonomische und ökologische Vorteile in sich vereinen.

Eine Möglichkeit, derartige Pflanzen bereitzustellen, besteht - neben züchterischen Maßnahmen - in der gezielten genetischen Veränderung des Stärkemetabolismus stärkeproduzierender Pflanzen durch gentechnologische Methoden. Voraussetzung hierfür ist jedoch die Identifizierung und Charakterisierung der an der Stärkesynthese - modifikation und -abbau (Stärkemetabolismus) beteiligten Enzyme sowie die Isolierung der entsprechenden, für diese Enzyme kodierenden DNA-Sequenzen.

Die biochemischen Synthesewege, die zum Aufbau von Stärke führen, sind im wesentlichen bekannt. Die Stärkesynthese in pflanzlichen Zellen findet in den Plastiden statt. In photosynthetisch aktiven Geweben sind dies die Chloroplasten, in photosynthetisch inaktiven, stärke-speichernden Geweben die Amyloplasten.

Wichtige am Stärkemetabolismus beteiligte Enzyme sind z.B. die Verzweigungsenzyme (branching enzyme), ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundene Stärkesynthasen, lösliche Stärkesynthasen, Entzweigungsenzyme (debranching enzyme), Disproportionierungsenzyme, plastidäre Stärkephosphorylasen, die R1- Enzyme (R1-Proteine), Amylasen oder Glukosidasen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, weiter bzw. alternative gentechnische Ansätze zur Modifizierung des Stärkemetabolismus in stärkebildenden Pflanzen (z.B. Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot) geeignete Nukleinsäuremoleküle zur Verfügung zu stellen, mittels derer Pflanzenzellen transformiert werden können, so daß die Synthese von veränderten, vorteilhaften Stärkevarietäten ermöglicht wird.

Solche veränderten Stärkevarietäten weisen z.B. Modifikationen in bezug auf ihren Verzweigungsgrad, das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, den Phosphatgehalt, die Stärkekorngröße und/oder die durchschnittliche Länge und Verteilung der Seitenketten (d.h. Seitenkettenstruktur) auf.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung ist es, Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die Herstellung transgener Pflanzen ermöglichen, die eine veränderte Stärkevarietät synthetisieren.

Überraschenderweise synthetisieren transgene Pflanzen, die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen transformiert wurden, eine Stärke, die in besonderer Weise in ihren physikochemischen Eigenschaften und/oder in ihrer Seitenkettenstruktur verändert ist, so daß die genannten Aufgaben durch die Bereitstellung der in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst werden.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Nukleinsäuremolekül, codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt oder deren Derivate oder Teile,
- b) Nukleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder deren Derivate oder Teile umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
- c) Nukleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuremolekülen hybridisieren oder komplementär sind, vorzugsweise spezifisch hybridisieren und

d) Nukleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nukleinsäuremoleküle abweicht.

Entsprechend betrifft die vorliegende Erfindung ein für eine  $\beta$ -Amylase codierendes Nukleinsäuremolekül, das eine Aminosäuresequenz gemäß Seq. ID Nr. 2 oder deren Derivate oder Teile davon gemäß dem cDNA-Insert des Plasmids St-b-Amy (DSM Nr. 12348) codiert, enthält. Die genannte erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase ist am Stärkestoffwechsel der Kartoffel beteiligt und ist direkt oder indirekt an der Stärkebiosynthese beteiligt.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das  $\beta$ -Amylase-Protein (bzw. dessen Polypeptid, Aminosäuresequenz) der Erfindung ein von Seq. ID Nr. 2 abgeleitetes Polypeptid, das mindestens 86 Aminosäurereste, vorzugsweise mindestens 120, insbesondere mindestens 155 und ganz besonders bevorzugt etwa 163-170 Aminosäurereste enthält, die aus der Gruppe der Aminosäurereste bestehend aus 112 V, 113 P, 114 V, 116 V, 117 M, 119 P, 120 L, 139 L, 142 L, 145 A, 146 G, 147 V, 149 G, 151 M, 153 D, 155 W, 156 W, 157 G, 160 E, 164 P, 167 Y, 169 W, 172 Y, 175 L, 183 G, 184 L, 185 K, 187 Q, 190 M, 191 S, 192 F, 193 H, 195 C, 196 G, 197 G, 198 N, 199 V, 200 G, 201 D, 205 I, 206 P, 208 P, 210 W, 211 V, 219 P, 220 D, 223 Y, 224 T, 228 G, 230 R, 231 N, 233 E, 234 Y, 238 G, 240 D, 243 P, 247 G, 248 R, 249 T, 254 Y, 256 D, 258 M, 261 F, 262 R, 273 I, 276 I, 278 V, 279 G, 281 G, 282 P, 284 G, 285 E, 286 L, 287 R, 288 Y, 289 P, 290 S, 291 Y, 292 P, 298 W, 300 F, 301 P, 302 G, 303 I, 304 G, 306 F, 307 Q, 308 C, 309 Y, 310 D, 311 K, 312 Y, 321 A, 325 G, 329 W, 336 D, 337 A, 338 G, 340 Y, 344 P, 347 T, 349 F, 350 F, 362 G, 364 F, 365 F, 368 W, 369 Y, 370 S, 373 L, 376 H, 380 I, 381 L, 384 A, 388 F, 393 V, 394 K, 398 K, 401 G, 402 I, 403 H, 404 W, 406 Y, 411 H, 412 A, 414 E, 415 L, 416 T, 417 A, 418 G, 419 Y, 420 Y, 421 N, 426 D, 427 G, 428 Y, 430 P, 431 I, 432 A, 438 H, 443 N, 444 F, 445 T, 446 C, 448 E, 449 M, 453 E, 454 Q, 458 A, 462 P, 465 L,

466 V, 468 Q, 469 V, 481 A, 483 E, 484 N, 485 A, 486 L, 488 R, 489 Y, 490 D, 493 A, 496 Q, 518 T, 519 Y, 520 L, 521 R, 526 L, 538 F, 539 V und 542 M gemäß Seq. ID Nr. 2 ausgewählt sind, und das mindestens etwa 1-61, vorzugsweise mindestens 122, insbesondere mindestens 170, bevorzugter mindestens 220 und ganz besonders bevorzugt etwa 232-241 Aminosäurereste enthält, die aus der Gruppe der Aminosäurereste bestehend aus 1 M, 2 A, 3 M, 4 S, 5 L, 6 P, 7 H, 8 Q, 9 I, 10 G, 11 A, 12 L, 13 S, 14 G, 15 T, 16 S, 17 L, 18 T, 19 A, 20 E, 21 T, 22 G, 23 G, 24 V, 25 S, 26 C, 27 E, 28 V, 29 P, 30 A, 31 K, 32 G, 33 S, 34 S, 35 A, 36 T, 38 A, 39 M, 40 W, 41 R, 42 T, 44 M, 45 T, 46 N, 47 L, 48 K, 49 V, 50 S, 51 V, 52 Q, 53 K, 54 T, 55 G, 56 T, 57 E, 58 I, 59 D, 60 R, 61 V, 62 S, 63 P, 64 S, 65 P, 66 S, 67 P, 68 P, 69 M, 70 S, 71 P, 73 M, 74 G, 75 G, 76 G, 78 R, 79 P, 80 D, 81 L, 82 L, 84 C, 85 Q, 86 A, 87 L, 88 M, 89 E, 90 A, 91 Q, 92 V, 93 D, 94 E, 95 V, 96 V, 97 E, 98 R, 99 E, 100 Y, 101 K, 103 R, 105 S, 107 E, 108 K, 109 E, 110 K, 111 G, 118 M, 122 S, 124 K, 126 D, 127 H, 128 T, 131 R, 132 K, 133 K, 140 Q, 144 S, 152 M, 161 R, 163 A, 170 G, 176 M, 177 E, 180 K, 186 V, 204 T, 209 R, 212 V, 215 M, 222 A, 226 Q, 227 W, 232 F, 235 V, 241 T, 242 L, 246 K, 251 V, 253 C, 260 G, 263 D, 267 N, 271 D, 272 T, 294 K, 295 D, 297 V, 299 K, 305 A, 314 I, 319 G, 323 A, 324 F, 331 H, 332 T, 335 T, 339 Q, 343 W, 348 N, 352 K, 353 E, 355 G, 356 G, 358 D, 360 Q, 363 E, 371 E, 372 M, 378 E, 382 Q, 383 S, 385 K, 386 A, 387 I, 389 E, 390 D, 391 K, 392 G, 395 I, 397 V, 399 I, 407 G, 413 P, 433 Q, 442 F, 447 V, 452 H, 456 Q, 459 L, 467 R, 470 A, 471 L, 474 Q, 475 E, 477 Q, 478 V, 479 P, 491 D, 492 Y, 494 H, 495 E, 499 Q, 500 A, 501 S, 502 S, 503 L, 505 I, 506 N, 508 Q, 509 S, 511 D, 513 E, 515 C, 524 P, 528 H, 529 P, 530 D, 534 R, 537 A, 546 K, 548 A, 549 N, 550 K, 551 C, 552 R, 555 V, 556 E, 558 E, 559 A, 560 E, 561 H, 562 F, 564 H, 565 I, 566 T, 567 Q, 568 P, 569 L, 570 V, 571 Q, 573 A, 574 A, 575 A, 576 A, 577 L, 578 M und 579 H (hier durch Einbuchstabencode für Aminosäuren angegeben) gemäß Seq. ID Nr. 2 ausgewählt sind.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung umfaßt der Begriff "Teil" in bezug auf das erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase-Protein (Polypeptid, Aminosäuresequenz) ein Poly- oder Oligopeptid, bestehend aus mindestens etwa 10-19, vorzugsweise mindestens 80, bevorzugter mindestens 160, besonders bevorzugt mindestens 320 und am meisten bevorzugt etwa 400-550 der Aminosäurereste der durch das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül codierten  $\beta$ -Amylase oder deren Derivate.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Nukleinsäuremolekül, das ein Nukleinsäuremolekül gemäß Seq. ID Nr. 1 enthält, gemäß dem cDNA-Insert des bei der DSZM am 24.07.1998 hinterlegten Plasmids DSM Nr. 12348 oder dessen Derivate oder Teile, insbesondere der codierenden Region oder deren Derivate oder Teile.

Im Sinne dieser Erfindung umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül (Nucleotidsequenz oder Polynucleotid) ein Polynucleotid, das mindestens 246 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 344, insbesondere mindestens 443, und ganz besonders bevorzugt etwa 467-487 Nucleotide enthält, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus 241 T, 245 T, 257 C, 268 G, 272 A, 279 T, 285 A, 290 A, 291 G, 307 A, 309 G, 311 A, 314 C, 320 A, 322 A, 323 A, 325 G, 334 G, 335 T, 337 C, 338 C, 340 G, 341 T, 343 T, 346 G, 347 T, 349 A, 350 T, 351 G, 353 T, 355 C, 356 C, 359 T, 361 G, 368 T, 370 A, 386 T, 400 G, 404 T, 406 A, 409 G, 416 T, 420 G, 425 T, 433 G, 434 C, 436 G, 437 G, 439 G, 440 T, 442 G, 443 A, 445 G, 446 G, 449 T, 451 A, 452 T, 453 G, 457 G, 458 A, 460 G, 463 T, 464 G, 465 G, 466 T, 467 G, 468 G, 469 G, 470 G, 473 T, 476 T, 478 G, 479 A, 487 G, 490 C, 491 C, 499 T, 500 A, 503 A, 505 T, 506 G, 507 G, 511 G, 514 T, 515 A, 524 T, 527 T, 533 T, 535 G, 539 A, 542 A, 547 G, 548 G, 551 T, 553 A, 554 A, 557 T, 559 C, 560 A, 562 G, 566 T, 568 A, 569 T, 570 G, 571 T, 572 C, 574 T, 575 T, 576 C, 577 C, 578 A, 583 T, 584 G, 586 G, 587 G, 589 G, 590 G, 592 A, 593 A, 595 G, 596 T, 598 G, 599 G, 601 G, 602 A, 610 A, 613 A, 614 T, 615 C, 616 C, 617 C, 620 T, 622 C, 623 C, 628 T,

629 G, 630 G, 631 G, 632 T, 637 G, 638 A, 653 A, 655 C, 656 C, 658 G, 659 A, 662 T, 667 T, 668 A, 669 C, 670 A, 671 C, 682 G, 683 G, 689 G, 690 G, 691 A, 692 A, 697 G, 698 A, 700 T, 701 A, 704 T, 710 T, 712 G, 713 G, 718 G, 719 A, 727 C, 728 C, 731 T, 734 T, 739 G, 740 G, 742 A, 743 G, 745 A, 746 C, 749 C, 752 T, 755 A, 760 T, 761 A, 766 G, 767 A, 768 T, 769 T, 771 C, 772 A, 773 T, 774 G, 779 G, 781 T, 782 T, 785 G, 787 G, 788 A, 794 T, 806 T, 811 G, 817 A, 818 T, 823 G, 824 A, 826 A, 827 T, 830 A, 832 G, 833 T, 835 G, 836 G, 839 T, 841 G, 842 G, 844 C, 845 C, 850 G, 851 G, 853 G, 854 A, 857 T, 860 G, 862 T, 863 A, 865 C, 866 C, 868 T, 869 C, 871 T, 872 A, 874 C, 875 C, 878 A, 880 A, 884 A, 886 G, 887 G, 892 T, 893 G, 894 G, 898 T, 899 T, 901 C, 902 C, 904 G, 905 G, 907 A, 908 T, 910 G, 911 G, 916 T, 917 T, 919 C, 920 A, 922 T, 923 G, 925 T, 926 A, 928 G, 929 A, 930 C, 931 A, 932 A, 934 T, 935 A, 938 T, 949 T, 950 T, 961 G, 962 C, 973 G, 974 G, 977 A, 980 C, 983 A, 985 T, 986 G, 987 G, 988 G, 1000 C, 1001 C, 1006 G, 1007 A, 1009 G, 1010 C, 1012 G, 1013 G, 1018 T, 1019 A, 1020 C, 1021 A, 1022 A, 1025 A, 1030 C, 1031 C, 1033 G, 1034 A, 1039 A, 1040 C, 1045 T, 1046 T, 1048 T, 1049 T, 1050 C, 1051 A, 1060 G, 1069 T, 1075 A, 1079 A, 1082 A, 1084 G, 1085 G, 1090 T, 1091 T, 1093 T, 1094 T, 1095 C, 1097 T, 1102 T, 1103 G, 1104 G, 1105 T, 1106 A, 1108 T, 1109 C, 1118 T, 1121 T, 1124 A, 1126 C, 1127 A, 1130 G, 1139 T, 1187 C, 1192 A, 1193 A, 1196 T, 1199 C, 1201 G, 1202 G, 1204 A, 1205 T, 1207 C, 1208 A, 1209 C, 1210 T, 1211 G, 1212 G, 1216 T, 1217 A, 1227 G, 1231 C, 1232 A, 1234 G, 1235 C, 1238 C, 1240 G, 1241 A, 1243 C, 1244 T, 1246 A, 1247 C, 1249 G, 1250 C, 1252 G, 1253 G, 1255 T, 1256 A, 1258 T, 1259 A, 1260 C, 1261 A, 1262 A, 1263 C, 1276 G, 1277 A, 1279 G, 1280 G, 1282 T, 1283 A, 1285 C, 1288 C, 1289 C, 1291 A, 1292 T, 1294 G, 1295 C, 1300 A, 1301 T, 1304 T, 1312 C, 1313 A, 1318 G, 1322 T, 1325 T, 1327 A, 1328 A, 1330 T, 1331 T, 1333 A, 1334 C, 1336 T, 1337 G, 1342 G, 1343 A, 1344 G, 1345 A, 1346 T, 1347 G, 1352 A, 1353 C, 1357 G, 1358 A, 1360 C, 1361 A, 1370 A, 1372 G, 1373 C, 1379 G, 1382 C, 1384 C, 1385 C, 1388 A, 1394 T, 1396 G, 1397 T, 1401 G, 1402 C, 1403 A, 1405 G, 1406 T, 1414 G, 1422 G, 1426 G, 1439 T, 1441 G,

1442 C, 1445 G, 1447 G, 1448 A, 1450 A, 1451 A, 1453 G, 1454 C, 1457 T, 1463 G, 1465 T, 1466 A, 1468 G, 1469 A, 1477 G, 1478 C, 1481 A, 1490 T, 1511 A, 1520 A, 1541 T, 1546 G, 1550 T, 1552 A, 1553 C, 1555 T, 1556 A, 1559 T, 1562 G, 1565 T, 1577 T, 1580 T, 1591 A, 1592 A, 1594 T, 1603 T, 1604 T, 1612 T, 1613 T, 1615 G, 1616 T, 1621 A, 1622 A, 1624 A, 1625 T, 1626 G, 1628 A, 1630 G, 1633 G, 1640 A, 1661 A, 1683 T, 1692 T, 1713 A, 1719 T, 1728 C und 1731 C gemäß Seq. ID Nr. 1 und das ferner mindestens etwa 1-127 Nucleotide, vorzugsweise mindestens 253, insbesondere mindestens 354, bevorzugter mindestens 455 und ganz besonders bevorzugt etwa 481-501 Nucleotide enthält, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus 1 A, 2 T, 3 G, 4 G, 5 C, 6 A, 7 A, 8 T, 9 G, 10 A, 11 G, 12 T, 13 C, 14 T, 15 G, 16 C, 17 C, 18 A, 19 C, 20 A, 21 C, 22 C, 23 A, 24 G, 25 A, 26 T, 27 C, 28 G, 29 G, 30 T, 31 G, 32 C, 33 C, 34 T, 35 T, 36 A, 37 T, 38 C, 39 A, 40 G, 41 G, 42 A, 43 A, 44 C, 45 A, 46 T, 47 C, 48 G, 49 C, 50 T, 51 C, 52 A, 53 C, 54 G, 55 G, 56 C, 57 G, 58 G, 59 A, 60 A, 61 A, 62 C, 63 C, 64 G, 65 G, 66 T, 67 G, 68 G, 69 A, 70 G, 71 T, 72 T, 73 T, 74 C, 75 A, 76 T, 77 G, 78 C, 79 G, 80 A, 81 A, 82 G, 83 T, 84 T, 85 C, 86 C, 87 G, 88 G, 89 C, 90 G, 92 A, 93 G, 94 G, 95 G, 96 G, 97 A, 99 T, 102 A, 103 G, 104 C, 105 T, 106 A, 109 T, 110 C, 111 A, 112 G, 113 C, 115 A, 116 T, 117 G, 118 T, 120 G, 121 A, 122 G, 123 A, 124 A, 125 C, 126 A, 127 C, 129 G, 131 T, 132 G, 133 A, 134 C, 135 G, 137 A, 138 T, 139 T, 140 T, 141 A, 142 A, 143 A, 144 A, 146 T, 148 T, 149 C, 150 G, 152 T, 153 A, 154 C, 155 A, 157 A, 160 A, 161 C, 162 A, 163 G, 165 A, 166 A, 167 C, 169 G, 171 A, 172 A, 174 T, 175 G, 176 A, 178 A, 179 G, 180 G, 181 G, 183 G, 184 T, 185 C, 188 C, 189 G, 190 T, 191 C, 195 G, 196 T, 199 C, 200 C, 201 G, 202 C, 203 C, 204 G, 205 A, 206 T, 207 G, 208 A, 209 G, 210 T, 211 C, 216 G, 217 A, 218 T, 226 G, 228 A, 229 A, 231 G, 233 G, 234 G, 237 G, 238 G, 239 A, 244 T, 246 A, 247 G, 250 T, 252 T, 254 A, 256 G, 260 T, 262 A, 263 T, 274 G, 275 T, 276 A, 277 G, 278 A, 284 T, 286 G, 287 T, 288 T, 293 G, 295 G, 297 A, 298 T, 301 A, 302 A, 304 G, 306 T, 308 G, 310 A, 313 T, 315 G, 324 A, 327 G, 328 A, 331 G, 333 A, 348 T, 352 A, 354 G, 358 T, 360 G, 363 T, 365 G, 369 G, 379 C, 383 C,

392 G, 393 G, 394 A, 395 A, 396 G, 397 A, 402 G, 408 T, 417 A, 419 A, 424 T, 430 A, 432 C, 447 G, 488 C, 495 A, 519 T, 528 G, 529 G, 538 A, 549 A, 556 G, 558 T, 567 G, 573 T, 588 T, 600 T, 611 C, 612 G, 618 T, 619 C, 621 T, 626 G, 633 T, 634 G, 639 G, 645 G, 657 A, 665 C, 666 A, 678 G, 681 G, 684 A, 687 G, 693 T, 694 T, 695 T, 703 G, 705 A, 708 G, 709 C, 717 C, 723 A, 726 T, 729 A, 732 T, 744 G, 747 T, 751 G, 756 A, 757 T, 758 G, 762 T, 777 A, 778 G, 780 G, 783 T, 789 T, 799 A, 805 C, 814 A, 815 C, 816 C, 859 C, 861 T, 864 T, 879 A, 882 A, 883 G, 885 T, 889 G, 890 T, 891 A, 912 T, 914 C, 915 T, 941 T, 942 C, 943 A, 951 A, 952 C, 956 G, 966 A, 970 T, 978 G, 992 A, 995 C, 996 C, 999 T, 1003 A, 1004 C, 1014 T, 1015 C, 1026 T, 1027 T, 1028 G, 1029 G, 1042 A, 1055 A, 1062 T, 1065 T, 1066 G, 1067 G, 1072 G, 1078 C, 1080 A, 1087 G, 1098 C, 1115 T, 1119 T, 1120 T, 1134 G, 1144 C, 1146 A, 1147 T, 1148 C, 1155 G, 1156 G, 1157 C, 1159 A, 1161 A, 1165 G, 1166 A, 1169 A, 1171 A, 1172 A, 1173 G, 1174 G, 1175 G, 1179 T, 1183 A, 1186 T, 1191 T, 1195 A, 1197 T, 1200 A, 1203 T, 1219 G, 1224 A, 1233 T, 1237 C, 1245 G, 1267 C, 1281 T, 1296 C, 1305 T, 1311 C, 1320 A, 1350 T, 1354 C, 1355 A, 1356 C, 1365 A, 1366 C, 1368 A, 1377 A, 1386 T, 1393 T, 1400 G, 1408 G, 1409 C, 1410 T, 1411 T, 1412 T, 1413 A, 1420 C, 1421 A, 1423 G, 1428 T, 1429 C, 1432 G, 1435 C, 1436 C, 1456 T, 1472 A, 1474 T, 1476 T, 1479 A, 1483 G, 1485 A, 1494 T, 1499 C, 1500 A, 1501 T, 1503 C, 1504 T, 1507 T, 1508 T, 1509 G, 1514 T, 1516 A, 1517 A, 1525 T, 1526 C, 1527 A, 1528 G, 1529 G, 1533 T, 1536 A, 1538 A, 1544 G, 1557 T, 1558 T, 1560 G, 1569 T, 1570 C, 1571 C, 1575 C, 1581 C, 1582 C, 1584 T, 1585 C, 1588 G, 1590 T, 1593 C, 1597 A, 1601 G, 1608 T, 1629 A, 1635 A, 1636 A, 1638 A, 1641 C, 1643 C, 1644 A, 1646 A, 1647 C, 1649 A, 1651 T, 1652 G, 1655 G, 1664 T, 1666 G, 1668 G, 1674 G, 1676 C, 1678 G, 1680 G, 1682 A, 1686 C, 1687 G, 1690 C, 1693 A, 1696 A, 1698 T, 1708 G, 1712 A, 1724 C, 1725 T, 1727 C, 1729 C, 1730 T, 1732 A, 1734 G, 1735 C, 1736 A und 1738 T gemäß Seq. ID Nr. 1.

Bei der oben explizit angegebenen Numerierung der Positionen der einzelnen Elemente



der erfindungsgemäßen Nukleotid- bzw. Aminosäure-Sequenzen gemäß Seq ID Nr. 1 bzw. Seq. ID Nr. 2 werden als Derivate der besagten erfindungsgemäßen Sequenzen auch solche Sequenzen verstanden, in denen die Numerierung der einzelnen Sequenzelemente von denen der erfindungsgemäßen Sequenzen ID Nr. 1 bzw. Nr. 2 abweichen kann. Maßgebend ist hierbei eine signifikante Übereinstimmung von mindestens einem Sequenzabschnitt ("Teil") mit der erfindungsgemäßen Sequenz. Solche Übereinstimmungen können gemäß dem allgemeinen Fachwissen z.B. durch geeignete Computer-Programme einfach ermittelt werden, indem z.B. ein Sequenzvergleich der erfindungsgemäßen Sequenz mit einer in Frage stehenden, zu vergleichenden Sequenz durchgeführt wird (sog. "Sequenz-Alignment"). Derartige Computer-Programme, die z.B. käuflich zu erwerben sind (z.B. Omega<sup>®</sup>, Version 1.1.3. der Firma Oxford Molecular Ltd., Oxford, UK) und die zum Teil auch integraler Bestandteil von Sequenzdatenbanken (z.B. EMBL, GenBank) sind, identifizieren z.B. die bestmögliche Übereinstimmung von identischen bzw. gegebenenfalls chemisch äquivalenten Sequenzelementen und berücksichtigen insbesondere das Vorliegen von Insertionen und/oder Deletionen, die zu einer Verschiebung einzelner Sequenzelemente oder von Sequenzabschnitten führen können und auf diese Weise die Numerierung der Sequenzelemente oder Sequenzabschnitte beeinflussen können.

Ferner umfaßt der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, ein Nukleinsäuremolekül, das durch Addition, Deletion, Insertion oder Rekombination eines oder mehrerer Nucleotide von Seq. ID Nr. 1 abweicht und die Bedingungen wie oben definiert erfüllt.

Außerdem beinhaltet der Begriff "Derivat" in bezug auf das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, eine komplementäre oder eine revers komplementäre Sequenz (Polynucleotid) des erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls oder von Derivaten oder Teilen davon.

Der Begriff "Teil", der sich auf das für eine  $\beta$ -Amylase codierende Nukleinsäuremolekül gemäß dieser Erfindung bezieht, umfaßt ein Poly- oder Oligonucleotid, bestehend aus mindestens etwa 15-35, vorzugsweise mindestens etwa 36-100, insbesondere mindestens 200, bevorzugter mindestens 400, besonders bevorzugt mindestens 800 und am meisten bevorzugt etwa 1400-1700 der Nucleotide eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, das für eine  $\beta$ -Amylase codiert, oder deren Derivate.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung umfassen die Begriffe "Derivat" und/oder "Teil" gemäß der vorliegenden Erfindung ein Polynucleotid, bzw. ein wie oben definiertes Poly- oder Oligopeptid, das eine funktionale und/oder strukturelle Äquivalenz des aus Kartoffel gewonnenen  $\beta$ -Amylase-Gens (d.h. des Nukleinsäuremoleküls, das für die  $\beta$ -Amylase codiert) bzw.  $\beta$ -Amylase-Polypeptids zeigt. Der Begriff "funktionale und/oder strukturelle Äquivalenz" bedeutet im allgemeinen die gleiche, eine äquivalente oder ähnliche Funktion des entsprechenden Moleküls der Erfindung, gegebenenfalls insbesondere biologische Funktion.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend a) eine Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase, vorzugsweise aus Kartoffel, oder Teile besagter Nukleotidsequenz und b) ein oder mehrere Nukleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärke-korn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen von Nukleotidsequenzen kodierend für Proteine ausgewählt aus der Gruppe A und Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, vorzugsweise ein Desoxyribonukleinsäure- oder Ribonukleinsäure-Molekül, besonders bevorzugt ein cDNA-Molekül. Besonders bevorzugt ist ein Nukleinsäuremolekül, das mit einem der besagten Nukleotidsequenzen oder deren

Teilen spezifisch hybridisiert.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäure codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel ist durch Seq. ID Nr. 1 dargestellt, das durch die Nukleotidsequenz kodierte Protein durch Seq. ID Nr. 2.

Seq. ID Nr. 1:

attaatattattattatggcaatgagtctgccacaccagatcggccttatcaggaaca  
tcgctcacggcggaaccgggtggagtttcatgcgaagttccggcgaaggggagttcagct  
acatcagctatgtggagaacaccgatgacgaatttaaagtatcggtaaaaaaacagga  
actgaaattgacaggggtgctgccgtcgccgtcgccgccgatgagtccgatgatgggagga  
ggaatgcggccggatttattagcgtgtcaagcgttgatggaagctcaggtagatgaggta  
gttgagagagaaatataagggttaggaattcgtcggagaaaagagaaaggagttccgggtgtt  
gttatgatgccgttgatagtgtgaaaatggatcatactgtgaataggaagaaggcgtg  
aatgcgagtttacaggcgttgaagagcgccggtgtggaagggattatgatggatgtgtgg  
tggggattggtggagagagatgcgccgggagagtataattggggcggttatgctgagctt  
atggaaatggcgaaaaaacatggactcaaagttcaagctgtgatgtcttccatcaatgt  
gggtggaacgtcgggtgattcctgcacgatccctcttccaagggtgggtgttgaggagatg  
gagaaggatccagatcttgcatacacagatcagtggggaaggaggaattttgaatatgta  
tcgcttggttgcgatacacttccagttcttaaaggaaggactcctgtccaatgctattct  
gatttcagtagaggggttagagatagatttgagaatctcctaggtgacaccattgtggaa  
attcaagtcgggatgggtccagctggagagctccgttatccatcctatccggaaaaagat  
ggagtatggaaattccctggaattgggtgcttttcagtgttatgacaagtacatgatcagt  
agcttacagggtgcagcagaagcttttgtaagcctgaatggggacacaccgggtccaacc  
gatgctgggtcagtacaacaattggccagaagataccaacttttcaagaaggaagggtggt  
ggatgggtagtcaatatggggagttcttctcacttgggtattctgagatgcttttgaa  
catgggtgagaggatactgcaatcagccaaggcgatattcgaggacaagggtgttaagatt  
tcagtttaagattgcaggtattcactggcactatggaacaagggtcccatgccctgagctg  
accgctggatactacaacaccgtaaccgagatgggttaccttccatcgcccaaagtctt  
gcccggcacgggtgcagttttcaacttcacatgtgttgagatgcgtgaccacgagcagcca

caagatgcactatgtgcacctgagaagttggtaggcaagtggcttagcaactcaggaa  
gctcaagttccacttgctggggagaatgcattgccacgatacgatgattatgcacatgaa  
cagatccttcaagcatcctcattgaatatcaacgatcaatcaggtgatagagagatgtgc  
gcggttacatatttgaggatgaatcctgacctattccatcctgataactggaggcgattc  
gttgccttcgtgaagaaaatgaaagaaggaaaagacgcaaacaatgccgggaacaagta  
gagagggaggcgagagcatttcgtgcatataactcagccgtagtgcaagaagctgcagct  
gccctcatgcactaagcaaatggttgtcaaatagtactgtaattttgatccttttagcta  
acatggagttttcaacatgttacgaggatcttatagctcgttatcgttcttcttatatg  
tttgtaaaactgtccatcgtgtatttttcgaagtttagacattatgtcttaatgaaatga  
tacataattcagtagtaaaaaaaaaaaaaaa

Seq. ID Nr. 2:

MAMSLPHQIGALSGTSLTAETGGVSCVPAKGSSATSAMWRTPM  
TNLKVSQKTGTEIDRVSPSPPPMSPMMGGGMRPDLLACQALM  
EAQVDEVVEREYKVRNSSEKEKGVFVMMPLDSVKMDHTVNR  
KKAMNASLQALKSAGVEGIMMDVWWGLVERDAPGEYNWGGYA  
ELMEMAKKHGLKVQAVMSFHQCGGNVGDSCITPLRWVVEEME  
KDPDLAYTDQWGRNFEYVSLGCDTLPVLKGRTPVQCYSDFMRG  
FRDRFENLLGDTIVEIQVGMGPAGELRYPSYPEKDGVWKFPGIGAF  
QCYDKYMISSLQGAAEAFGKPEWGHTGPTDAGQYNNWPEDTNFF  
KKEGGGWDSQYGEFFLTWYSEMLLNHGERILQSAKAIFEDKGVKI  
SVKIAGIHWYHGTTRSHAPELTAGYYNTRNRDGYLPQAQMLARHGA  
VFNFTEVEMRDHEQPQDALCAPEKLVRQVALATQEAQVPLAGENA  
LPRYDDYAHEQLQASSLNINDQSGDREMCAFTYLRMNPDLFHPDN  
WRRFVAFVKKMKEGKDANKCREQVEREAHFVHITQPLVQEAAAA  
LMH

Die erfindungsgemäße  $\beta$ -Amylase-Nukleotidsequenz weist zu bekannten  $\beta$ -Amylase-kodierenden Molekülen (Wang et al., 1997, Plant Physiol. 113(2):403-409; Yoshigi et

al., 1994, *Biotechn. & Biochem.* 58(6):1080-1086; Monroe et al., 1991, *Plant Physiol.* 97:1599-1601) eine vergleichsweise geringe Sequenzhomologie auf. Die Aminosäuresequenz unterscheidet sich darüber hinaus von den im Stand der Technik beschriebenen  $\beta$ -Amylasen durch eine zusätzliche N-terminale Sequenz (Aminosäuren der Position 1-25), die auch entsprechend auf der Ebene der Nukleotidsequenz repräsentiert wird.

Erfindungsgemäß geeignete Nukleotidsequenzen, die für ein Protein der Gruppe A kodieren, sind beispielsweise für lösliche (Typ I, II, III oder IV) oder Stärkekorn-gebundene Stärkesynthase-Isoformen beschrieben in Hergersberg, 1988, Dissertation, Universität Köln; Abel, 1995, Dissertation FU Berlin; Abel et al., 1996, *Plant Journal* 10(6):981-991; Visser et al., 1989, *Plant Sci.* 64:185-192; van der Leij et al., 1991, *Mol. Gen. Genet.* 228:240-248; EP-A-0779363; WO 92/11376; WO 96/15248; WO 97/26362; WO 97/44472; WO 97/45545; Delrue et al., 1992, *J. Bacteriol.* 174: 3612-3620; Baba et al., 1993, *Plant Physiol.* 103:565-573; Dry et al., 1992, *The Plant Journal* 2,2: 193-202 oder auch in den EMBL Datenbank Einträgen X74160; X58453; X88789; X 94400; für Verzweigungsenzym-Isoformen (branching enzyme I, Iia oder Iib), Entzweigungsenzym-Isoformen (debranching enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen, R1- Enzyme) oder Disproportionierungsenzym-Isoformen beispielsweise beschrieben in WO 92/14827; WO 95/07335; WO 95/09922; WO 96/19581; WO 97/22703; WO 97/32985; WO 97/42328; Takaha et al., 1993, *J. Biol. Chem.* 268: 1391-1396 oder auch in dem EMBL Datenbank Eintrag X83969 und solche für ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen und plastidäre Stärkephosphorylase-Isoformen beispielsweise beschrieben in EP-A-0368506; EP-A-0455316; WO 94/28146; DE 19653176.4; WO 97/11188; Brisson et al., 1989, *The Plant Cell* 1:559-566; Buchner et al., 1996, *Planta* 199:64-73; Camirand et al., 1989, *Plant Physiol.* 89(4 Suppl.) 61; Bhatt & Knowler, *J. Exp. Botany* 41 (Suppl.) 5-7; Lin et al., 1991, *Plant Physiol.* 95:1250-1253; Sonnewald et al., 1995, *Plant Mol. Biol.* 27:567-576; DDBJ Nr. D23280; Lorberth et al., 1998, *Nature Biotechnology* 16:473-477.

Die erfindungsgemäß geeignet einzusetzenden Nukleotidsequenzen sind pro- oder eukaryontischen Ursprungs, vorzugsweise bakteriellen, pilzlichen oder pflanzlichen Ursprungs.

Der Begriff "Teile von Nukleotidsequenzen" bedeutet im Sinne der vorliegenden Erfindung Teile der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleotidsequenzen, die mindestens 15 bp, vorzugsweise mindestens 150 bp, besonders bevorzugt mindestens 500 bp lang sind, jedoch eine Länge von 5000 bp, vorzugsweise 2500 bp nicht überschreiten.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen dieser Erfindung eine Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) beschrieben sind.

Besonders bevorzugt erfolgt eine "spezifische Hybridisierung", unter den folgenden hoch-stringenten Bedingungen:

Hybridisierungspuffer: 2 x SSC; 10 x Denhardt-Lösung (Fikoll 400 + PEG + BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1% SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 250 µg/ml

Heringssperma-DNA; 50 µg/ml tRNA; oder 0,25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS bei einer

Hybridisierungstemperatur: T = 55 bis 68°C,

Waschpuffer: 0,2 x SSC; 0,1% SDS und

Waschtemperatur: T = 40 bis 68°C.

Die mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen auch Fragmente, Derivate und allelische Varianten der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Unter Fragmenten werden dabei Teile der Nukleinsäuremo-

leküle verstanden, die lang genug sind, um einen Teil der beschriebenen Proteine zu codieren. Der Ausdruck Derivat bedeutet in diesem Zusammenhang, daß die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Homologie zu diesen Sequenzen aufweisen. Homologie bedeutet dabei eine Sequenzidentität von mindestens 60 %, vorzugsweise über 70 % und besonders bevorzugt über 85 %. Die Abweichungen zu den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen können dabei durch Deletionen, Substitutionen, Insertionen oder Rekombinationen entstanden sein.

Homologie bedeutet ferner, daß funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nukleinsäuremolekülen oder den durch sie kodierten Proteinen, besteht. Bei den Nukleinsäuremolekülen, die homolog zu den erfindungsgemäßen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-Techniken erzeugte Varianten.

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekülen kann es sich um DNA-Moleküle handeln, insbesondere um cDNA- oder genomische Moleküle. Ferner können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle RNA-Moleküle sein. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle oder Teile davon können z. B. aus natürlichen Quellen gewonnen sein, durch rekombinante Techniken oder synthetisch hergestellt sein.

Zur Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in sense- oder antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen werden diese mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage. Der Promotor kann dabei so gewählt sein, daß die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt, der z.B. chemisch oder biologisch induzierbar sein kann. In Bezug auf die transformierte Pflanze kann der Promotor - wie auch die Nukleotidsequenz - homolog oder heterolog sein. Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J. 8:23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7943-7947; Stockhaus et al., 1989, EMBO J. 8: 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen oder Promotoren von Zein-Genen aus Mais.

Eine das erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül abschließende Terminationssequenz kann der korrekten Beendigung der Transkription dienen, sowie der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript, dem eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen wird. Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., 1989, EMBO J. 8:23-29) und sind beliebig austauschbar.

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle können für die Herstellung transgener Pflanzenzellen und Pflanzen verwendet werden, die in der Aktivität der  $\beta$ -Amylase oder in der Aktivität der  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Enzyms des Stärkemetabolismus erhöht oder erniedrigt sind. Hierfür werden die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in geeignete Vektoren eingebracht, mit den notwendigen regulatorischen Nukleinsäure-Sequenzen für eine effiziente Transkription



in pflanzlichen Zellen versehen und in pflanzliche Zellen eingeführt. Es besteht zum einen die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen  $\beta$ -Amylase oder der endogenen  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden. Dies kann mit Hilfe von antisense-Konstrukten, in vivo Mutagenese, eines auftretenden Cosuppressionseffektes oder mit Hilfe von in entsprechender Weise konstruierten Ribozymen erreicht werden. Andererseits können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Expression der  $\beta$ -Amylase oder der  $\beta$ -Amylase und mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden und so zu einer Steigerung der Aktivität der jeweils exprimierten Enzyme in den Zellen führen.

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle zur Inhibierung der Synthese der endogenen  $\beta$ -Amylase und der Überexpression mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in den Zellen zu verwenden.

Schließlich können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auch zur Expression der  $\beta$ -Amylase und der Inhibierung mindestens eines weiteren Proteins der Gruppe A in Zellen transgener Pflanzen verwendet werden. Die beiden letztgenannten Ausführungsformen der Erfindung führen so zu einer gleichzeitigen Hemmung und Steigerung der Aktivitäten der jeweils inhibierten bzw. exprimierten Enzyme in den Zellen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Vektor, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül.

Der Begriff "Vektor" umfaßt Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige Vektoren, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle enthalten und zur Transformation von Zellen geeignet sind. Vorzugsweise sind derartige Vektoren zur Transformation pflanzlicher Zellen geeignet. Besonders

b vorzugt erlauben sie die Integration der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle, gegebenenfalls zusammen mit flankierenden regulatorischen Regionen, in das Genom der Pflanzenzelle. Beispiele hierfür sind binäre Vektoren, wie pBinAR oder pBinB33, die bei dem Agrobakterien-vermittelten Gentransfer eingesetzt werden können.

In einer bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase codiert oder deren Teile in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.

In noch einer weiteren bevorzugten Ausführungsform zeichnet sich der erfindungsgemäße Vektor dadurch aus, daß die Nukleotidsequenz, die für mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teilen davon kodiert, teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.

Der erfindungsgemäße Vektor ist ganz besonders bevorzugt mit regulatorischen Elementen verknüpft, die die Expression, d.h. z.B. die Transkription und Synthese einer RNA, die im Fall einer in sense-Richtung vorliegenden Nukleotidsequenz translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

Darüberhinaus ist es möglich, mittels gängiger molekularbiologischer Techniken (siehe z.B. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. Aufl. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY) verschiedenartige Mutationen in die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen einzuführen, wodurch es zur Synthese von Proteinen mit gegebenenfalls veränderten biologischen Eigenschaften kommt. Hierbei ist zum einen die Erzeugung von Deletionsmutanten möglich, bei

den durch fortschreitende Deletionen vom 5'- oder vom 3'- Ende der kodierenden DNA-Sequenzen erzeugt werden, die zur Synthese entsprechend verkürzter Proteine führen. Durch derartige Deletionen am 5'-Ende der DNA-Sequenz ist es beispielsweise möglich, gezielt Enzyme herzustellen, die durch Entfernen der entsprechenden Transit- oder Signal-Sequenzen nicht mehr in ihrem ursprünglichen (homologen) Kompartiment, sondern im Cytosol, oder aufgrund der Addition von anderen Signalsequenzen in einem oder mehreren anderen (heterologen) Kompartimenten lokalisiert sind.

Andererseits ist auch die Einführung von Punktmutationen denkbar an Positionen, bei denen eine Veränderung der Aminosäuresequenz einen Einfluß beispielsweise auf die Enzymaktivität oder die Regulierung des Enzyms hat. Auf diese Weise können z.B. Mutanten hergestellt werden, die einen veränderten  $K_M$ - oder  $k_{cat}$ -Wert besitzen oder die nicht mehr den normalerweise in der Zelle vorliegenden Regulationsmechanismen über allosterische Regulation oder kovalente Modifizierung unterliegen.

Für die gentechnische Manipulation in prokaryontischen Zellen können die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Teile dieser Sequenzen in Plasmide eingebracht werden, die eine Mutagenese oder eine Sequenzveränderung durch Rekombination von DNA-Sequenzen erlauben. Mit Hilfe von molekularbiologischen Standardverfahren (vgl. Sambrook et al., 1989, loc.cit.) können Basenaustausche vorgenommen oder natürliche oder synthetische Sequenzen hinzugefügt werden. Für die Verbindung der DNA-Fragmente untereinander können an die Fragmente Adaptoren oder *linker* angesetzt werden. Ferner können Manipulationen, die passende Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stellen oder die überflüssige DNA oder Restriktionsschnittstellen entfernen, eingesetzt werden. Wo Insertionen, Deletionen oder Substitutionen in Frage kommen, können *in vitro*-Mutagenese, "*primer repair*", Restriktion oder Ligation verwendet werden. Als Analysemethoden werden im allgemeinen eine Sequenzanalyse, eine Restriktionsanalyse und ggf. weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z.B. aus E.coli, Agrobacterium, Solananceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält oder die von einer Zelle, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurde, abstammt.

Noch ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, vorzugsweise bakterielle oder pflanzliche Zellen (z.B. aus E.coli, Agrobacterium, Solananceae, Poideae, Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago, Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne, Bohne, Banane oder Arrowroot), die neben einem rekombinanten Nukleinsäuremolekül codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase, ein oder mehrere weitere rekombinante Nukleinsäuremoleküle enthält, die für ein Protein ausgewählt aus der Gruppe A kodieren, oder deren Teilen oder mit diesen Nukleinsäuremolekülen hybridisierende Nukleotidsequenzen.

Neben der Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle lassen sich die erfindungsgemäßen Wirtszellen ggf. auch durch sukzessive Transformation herstellen (sog. "Supertransformation"), indem einzelne Nukleotidsequenzen oder Vektoren enthaltend Nukleotidsequenzen, die für ein Protein codieren mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärkekorn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen I, II, III oder IV, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen davon, sowie Nukleinsäuremoleküle, die mit einem der b sagten Nukleotidsequenzen oder deren Teilen hybridisiert, in mehreren,

aufeinanderfolgenden Transformationen der Zellen eingesetzt werden.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül oder ein erfindungsgemäßer Vektor in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.

Durch die Bereitstellung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, mit Hilfe gentechnischer Methoden in den Stärkemetabolismus von Pflanzen einzugreifen und ihn dahingehend zu verändern, daß es zur Synthese einer modifizierten Stärke kommt, die beispielsweise in bezug auf Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation oder auch in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften wie Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft, Enzymstabilität, Verdaulichkeit oder Reaktivität im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist. Durch eine Erhöhung der Aktivität von am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen, beispielsweise durch Überexpression entsprechender Nukleinsäuremoleküle, oder durch die Bereitstellung von Mutanten, die nicht mehr den zelleigenen Regulationsmechanismen unterliegen und/oder unterschiedliche Temperaturabhängigkeiten in bezug auf ihre Aktivität besitzen, besteht die Möglichkeit der Ertragssteigerung in entsprechend gentechnisch veränderten Pflanzen. Durch die Steigerung der Aktivität einer oder mehrerer am Stärkemetabolismus beteiligten Proteinen in bestimmten Zellen der stärkespeichernden Gewebe transformierter Pflanzen wie z.B. in der Knolle bei der Kartoffel oder in dem Endosperm von Mais oder Weizen kann es zu einer besonders ausgeprägten Ertragssteigerung kommen. Die wirtschaftliche Bedeutung und die

Vorteile dieser Möglichkeiten des Eingriffs in den Stärkemetabolismus liegen auf der Hand.

Bei der Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in Pflanzen besteht grundsätzlich die Möglichkeit, daß das synthetisierte Protein in jedem beliebigen Kompartiment der pflanzlichen Zelle lokalisiert sein kann. Um die Lokalisation in einem bestimmten Kompartiment (Cytosol, Vakuole, Apoplast, Plastiden, Mitochondrien) zu erreichen, muß die die Lokalisation gewährleistende Transit- oder Signalsequenz ggf. deletiert (entfernt) werden und die verbleibende codierende Region gegebenenfalls mit DNA-Sequenzen verknüpft werden, die die Lokalisierung in dem jeweiligen Kompartiment gewährleisten. Derartige Sequenzen sind bekannt (siehe beispielsweise Braun et al., EMBO J. 11 (1992), 3219-3227; Wolter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 846-850; Sonnewald et al., Plant J. 1 (1991), 95-106).

Die Herstellung von Pflanzenzellen mit einer verringerten Aktivität eines am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins kann beispielsweise erzielt werden durch die Expression einer entsprechenden antisense-RNA, einer sense-RNA zur Erzielung eines Cosuppressionseffektes, in vivo Mutagenese oder die Expression eines entsprechend konstruierten Ribozyms, das spezifisch Transkripte spaltet, die eines der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine codieren, unter Verwendung eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls, vorzugsweise durch Expression eines antisense-Transkripts.

Hierzu kann zum einen ein DNA-Molekül verwendet werden, das die gesamte für ein am Stärkemetabolismus beteiligtes Protein codierende Sequenz einschließlich eventuell vorhandener flankierender Sequenzen umfaßt, als auch DNA-Moleküle, die nur Teile der codierenden Sequenz umfassen, wobei diese Teile eine Mindestlänge von 15 bp, vorzugsweise von mindestens 100-500 bp, und insbesondere von über 500 bp aufweisen. In der Regel werden DNA-Moleküle verwendet, die kürzer als 5000 bp, vorzugsweise kürzer als 2500 bp sind.

Möglich ist auch die Verwendung von DNA-Sequenzen, die einen hohen Grad an Homologie zu den Sequenzen der erfindungsgemäßen DNA-Moleküle aufweisen, aber nicht vollkommen identisch sind. Die minimale Homologie sollte größer als ca. 65 % sein. Die Verwendung von Sequenzen mit einer Homologie von 75% und insbesondere 80 % ist zu bevorzugen.

Die Expression von Ribozymen zur Verringerung der Aktivität von bestimmten Proteinen in Zellen ist dem Fachmann bekannt und ist beispielsweise beschrieben in EP-B1-0 321 201. Die Expression von Ribozymen in pflanzlichen Zellen wurden z.B. beschrieben in Feyter et al. (Mol. Gen. Genet. 250 (1996), 329-338).

Ferner kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Proteine in den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen auch durch die sogenannte "in vivo-Mutagenese" erreicht werden, bei der durch Transformation von Zellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in Zellen eingeführt wird (Kipp P.B. et al., Poster Session beim "5<sup>th</sup> International Congress of Plant Molecular Biology, 21-27, September 1997, Singapore; R.A. Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15 (1997), 441-447; internationale Patentanmeldung WO 95/15972; Kren et al., Hepatology 25 (1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273 (1996), 1386-1389).

Ein Teil der DNA-Komponente des hierbei verwendeten RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer Nucleinsäuresequenz eines endogenen Proteins, weist jedoch im Vergleich zur Nucleinsäuresequenz des endogenen Proteins eine Mutation auf oder enthält eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.

Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und des endogenen Nucleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination kann die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder

h homologen Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt zu einer Verringerung der Aktivität des am Stärkemetabolismus beteiligten Proteins.

Alternativ kann die Verringerung der am Stärkemetabolismus beteiligten Enzymaktivitäten in den Pflanzenzellen durch einen Cosuppressionseffekt erfolgen. Dieses Verfahren ist dem Fachmann bekannt und beispielsweise beschrieben in Jorgensen (Trends Biotechnol. 8 (1990), 340-344), Niebel et al., (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 91-103), Flavell et al. (Curr. Top. Microbiol. Immunol. 197 (1995), 43-46), Palaqui und Vaucheret (Plant. Mol. Biol. 29 (1995), 149-159), Vaucheret et al., (Mol. Gen. Genet. 248 (1995), 311-317), de Borne et al. (Mol. Gen. Genet. 243 (1994), 613-621) und anderen Quellen.

Zur Inhibierung der Synthese mehrerer an der Stärkebiosynthese beteiligter Enzyme in den transformierten Pflanzen können DNA-Moleküle zur Transformation verwendet werden, die gleichzeitig mehrere, die entsprechenden Enzyme codierenden Regionen in antisense-Orientierung unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors enthalten. Hierbei kann alternativ jede Sequenz unter der Kontrolle eines eigenen Promotors stehen, oder die Sequenzen können als Fusion von einem gemeinsamen Promotor transkribiert werden, so daß die Synthese der betreffenden Proteine in etwa gleichem oder unterschiedlichem Ausmaß inhibiert wird. Für die Länge der einzelnen codierenden Regionen, die in einem derartigen Konstrukt verwendet werden, gilt das, was oben bereits für die Herstellung von antisense-Konstrukten ausgeführt wurde. Eine obere Grenze für die Anzahl der in einem derartigen DNA-Molekül von einem Promotor aus transkribierten antisense-Fragmente gibt es im Prinzip nicht. Das entstehende Transkript sollte aber in der Regel eine Länge von 25 kb, vorzugsweise von 15 kb nicht überschreiten.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle ist es möglich, Pflanzenzellen zu transformieren und die Synthese mehrerer Enzyme gleichzeitig zu inhibieren.



Weiterhin können die erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle in klassische Mutanten eingebracht werden, die in bezug auf ein oder mehrere Gene der Stärkebiosynthese defizient oder defekt sind (Shannon und Garwood, 1984, in Whistler, BeMiller und Paschall, Starch: Chemistry and Technology, Academic Press, London, 2nd Edition: 25-86). Diese Defekte können sich z.B. auf folgende Proteine beziehen: Stärkekorn-gebundene (GBSS I) und lösliche Stärkesynthasen (SSS I, II, III und IV), Verzweigungsenzyme (BE I, IIa und IIb), "Debranching"-Enzyme (R-Enzyme, Isoamylasen, Pullulanasen), Disproportionierungsenzyme und plastidäre Stärkephosphorylasen.

Die vorliegende Erfindung betrifft somit auch transgene Pflanzenzellen, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren, die mit einem erfindungsgemäßen Nukleinsäuremolekül oder Vektor transformiert wurden, sowie transgene Pflanzenzellen, die von derartig transformierten Zellen abstammen. Die erfindungsgemäßen Zellen enthalten ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül, wobei dieses vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Elementen verknüpft ist, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten, insbesondere mit einem Promotor. Die erfindungsgemäßen Zellen lassen sich von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen unter anderem dadurch unterscheiden, daß sie ein erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in diesen Zellen nicht vorkommt oder dadurch, daß ein solches Molekül an einem Ort im Genom der Zelle integriert vorliegt, an dem es sonst nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen dadurch unterscheiden, daß sie mindestens eine Kopie eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die Zellen eingeführten Nukleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Zellen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden insbesondere

dadurch unterscheiden, daß diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind) an denen sie natürlicherweise nicht vorkommt (vorkommen). Dies läßt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.

Bevorzugt sind solche erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, in denen die Enzymaktivität einzelner, am Stärkemetabolismus beteiligter Enzyme zu mindestens 10%, besonders bevorzugt zu mindestens 30% und ganz besonders bevorzugt um mindestens 50% erhöht oder erniedrigt ist.

Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen von natürlicherweise vorkommenden Pflanzenzellen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, so weisen die transgenen Pflanzenzellen Transkripte der eingeführten erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachweisen. Beispielsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen ein oder mehrere Proteine, die durch ein eingeführtes erfindungsgemäßes Nukleinsäuremolekül codiert werden. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.

Ist das eingeführte erfindungsgemäße Nukleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle, können die erfindungsgemäßen Zellen von natürlicherweise auftretenden beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression erfindungsgemäßer Nukleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die transgenen Pflanzenzellen enthalten z.B. mehr oder weniger Transkripte der erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse nachgewiesen werden. "Mehr" bzw. "weniger" bedeutet dabei vorzugsweise mindestens 10% mehr bzw. weniger, bevorzugt mindestens 20% mehr bzw. weniger und besonders bevorzugt mindestens 50% mehr bzw. weniger Transkripte als entsprechende nicht-transformierte Zellen. Vorzugsweise weisen die Zellen ferner eine entsprechende (mindestens 10%, 20%

bzw. 50%ig ) St igerung bzw. Verminderung des Gehalts an erfindungsgemäßen Protein auf. Die transgenen Pflanzenzellen können nach dem Fachmann bekannten Techniken zu ganzen Pflanzen regeneriert werden.

Die durch Regeneration der erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen erhältlichen Pflanzen sowie Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen durch Regeneration von ganzen Pflanzen aus den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung. Ferner sind Gegenstand der Erfindung Pflanzen, die die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen enthalten. Bei den transgenen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Spezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise sind dies stärkepeichernde Pflanzen, wie z.B. Getreidearten (Roggen, Gerste, Hafer, Mais, Weizen, Hirse, Sago etc.), Reis, Erbse, Markerbse, Maniok, Kartoffel, Tomate, Raps, Sojabohne, Hanf, Flachs, Sonnenblume, Kuherbse, Mungbohne oder Arrowroot.

Die Erfindung betrifft ebenfalls Vermehrungsmaterial der erfindungsgemäßen Pflanzen, beispielsweise Früchte, Samen, Knollen, Wurzelstöcke, Sämlinge, Stecklinge, Kalli, Protoplasten, Zellkulturen etc..

Durch die Veränderung der enzymatischen Aktivitäten der in den Stärkemetabolismus involvierten Enzyme kommt es zur Synthese einer in ihrer Struktur veränderten Stärke in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Pflanzen.

Zur Vorbereitung der Einführung fremder Gene in höhere Pflanzen stehen eine große Anzahl von Klonierungsvektoren zur Verfügung, die ein Replikationssignal für *E.coli* und ein Markergen zur Selektion transformierter Bakterienzellen enthalten. Beispiele für derartige Vektoren sind pBR322, pUC-Serien, M13mp-Serien, pACYC184 usw.

Die gewünschte Sequenz kann an einer passenden Restriktionsschnittstelle in den Vektor eingeführt werden. Das erhaltene Plasmid wird für die Transformation von *E.coli*-Zellen verwendet. Transformierte *E.coli*-Zellen werden in einem geeigneten Medium gezüchtet, anschließend geerntet und lysiert. Das Plasmid wird wiedergewonnen. Als Analysemethoden zur Charakterisierung der gewonnenen Plasmid-DNA werden im allgemeinen Restriktionsanalysen, Gelelektrophoresen und weitere biochemisch-molekularbiologische Methoden eingesetzt (Sambrook et al. loc.cit.). Nach jeder Manipulation kann die Plasmid DNA gespalten und gewonnene DNA-Fragmente mit anderen DNA-Sequenzen verknüpft werden. Jede Plasmid-DNA-Sequenz kann in den gleichen oder anderen Plasmiden kloniert werden.

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle stehen eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten, mittels Polyethylenglykol (PEG), die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung von DNA mittels der biolistischen Methode sowie weitere Möglichkeiten.

Bei der Injektion und Elektroporation von DNA in Pflanzenzellen werden an sich keine speziellen Anforderungen an die verwendeten Plasmide bzw. DNA gestellt. Es können einfache Plasmide wie z.B. pUC-Derivate verwendet werden. Sollen aus derartig transformierten Zellen ganze Pflanzen regeneriert werden, ist jedoch die Anwesenheit eines selektierbaren Markergens notwendig.

Je nach Einführungsmethode gewünschter Gene in die Pflanzenzelle können weitere DNA-Sequenzen erforderlich sein. Werden z.B. für die Transformation der Pflanzenzelle das Ti- oder Ri-Plasmid verwendet, so muß mindestens die rechte Begrenzung, häufig jedoch die rechte und linke Begrenzung der Ti- und Ri-Plasmid T-DNA als Flankenbereich mit den einzuführenden Genen verbunden werden.

Werden für die Transformation Agrobakterien verwendet, muß die einzuführende DNA in spezielle Plasmide kloniert werden, und zwar entweder in einen intermediären Vektor oder in einen binären Vektor. Die intermediären Vektoren können aufgrund von Sequenzen, die homolog zu Sequenzen in der T-DNA sind, durch homologe Rekombination in das Ti- oder Ri-Plasmid der Agrobakterien integriert werden. Dieses enthält außerdem die für den Transfer der T-DNA notwendige *vir*-Region. Intermediäre Vektoren können nicht in Agrobakterien replizieren. Mittels eines Helferplasmids kann der intermediäre Vektor auf *Agrobacterium tumefaciens* übertragen werden (Konjugation). Binäre Vektoren können sowohl in *E.coli* als auch in Agrobakterien replizieren. Sie enthalten ein Selektionsmarker-Gen und einen *Linker* oder *Polylinker*, welche von der rechten und linken T-DNA Grenzregion eingerahmt werden. Sie können direkt in die Agrobakterien transformiert werden (Holsters et al. (1978) Mol. Gen. Genet. 163:181-187). Das als Wirtszelle dienende Agrobakterium sollte ein Plasmid, das eine *vir*-Region trägt, enthalten. Die *vir*-Region ist für den Transfer der T-DNA in die Pflanzenzelle notwendig. Zusätzliche T-DNA kann vorhanden sein. Das derartig transformierte Agrobakterium wird zur Transformation von Pflanzenzellen verwendet.

Die Verwendung von T-DNA für die Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, In: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V., Alblasterdam (1985), Chapter V; Fraley et al., Crit. Rev. Plant. Sci., 4: 1-46 und An et al. (1985) EMBO J. 4: 277-287 beschrieben worden.

Für den Transfer der DNA in die Pflanzenzelle können Pflanzen-Explantate zweckmäßigerweise mit *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* kokultiviert werden. Aus dem infizierten Pflanzenmaterial (z.B. Blattstücke, Stengelsegmente, Wurzeln, aber auch Protoplasten oder Suspensions-kultivierte Pflanzenzellen) können dann in einem geeigneten Medium, welches Antibiotika oder Biozide zur Selektion transformierter Zellen enthalten kann, wieder ganze Pflanzen

regeneriert werden. Die so erhaltenen Pflanzen können dann auf Anwesenheit der eingeführten DNA untersucht werden. Andere Möglichkeiten der Einführung fremder DNA unter Verwendung des biolistischen Verfahrens oder durch Protoplastentransformation sind bekannt (vgl. z.B. Willmitzer, L, 1993 Transgenic plants. In: Biotechnology, A Multi-Volume Comprehensive Treatise (H.J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, eds.), Vol. 2, 627-659, VCH Weinheim-New York-Basel-Cambridge).

Während die Transformation dikotyler Pflanzen über Ti-Plasmid-Vektorsysteme mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* wohl etabliert ist, weisen neuere Arbeiten darauf hin, daß auch monokotyle Pflanzen der Transformation mittels *Agrobacterium* basierender Vektoren sehr wohl zugänglich sind (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6 (1994), 271-282).

Alternative Systeme zur Transformation von monokotylen Pflanzen sind die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes, die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern.

Spezifisch die Transformation von Mais wird in der Literatur verschiedentlich beschrieben (vgl. z.B. WO95/06128, EP 0 513 849; EP 0 465 875). In EP 292 435 wird ein Verfahren beschrieben, mit Hilfe dessen, ausgehend von einem schleimlosen, weichen (friable) granulösen Mais-Kallus, fertile Pflanzen erhalten werden können. Shillito et al. (Bio/Technology 7 (1989), 581) haben in diesem Zusammenhang beobachtet, daß es ferner für die Regenerierbarkeit zu fertilen Pflanzen notwendig ist, von Kallus-Suspensionskulturen auszugehen, aus denen eine sich teilende Protoplastenkultur, mit der Fähigkeit zu Pflanzen zu regenerieren, herstellbar ist. Nach einer in vitro Kultivierungszeit von 7 bis 8 Monaten erhalten Shillito et al. Pflanzen mit lebensfähigen Nachkommen, die jedoch Abnormalitäten in der Morphologie und der Reproduktivität aufweisen. Prioli und Söndahl (Bio/Technology 7 (1989), 589)

beschreiben ebenfalls die Regeneration und die Gewinnung fertiler Mais-Pflanzen aus Mais-Protoplasten.

Ist die eingeführte DNA einmal im Genom der Pflanzenzelle integriert, so ist sie dort in der Regel stabil und bleibt auch in den Nachkommen der ursprünglich transformierten Zelle erhalten. Sie enthält normalerweise einen Selektionsmarker, der den transformierten Pflanzenzellen Resistenz gegenüber einem Biozid oder einem Antibiotikum wie Kanamycin, G 418, Bleomycin, Hygromycin oder Phosphinothricin u.a. vermittelt. Der individuelle gewählte Marker sollte daher die Selektion transformierter Zellen gegenüber Zellen, denen die eingeführte DNA fehlt, gestatten.

Die transformierten Zellen wachsen innerhalb der Pflanze in der üblichen Weise (siehe auch McCormick et al. (1986) Plant Cell Reports 5:81-84). Die resultierenden Pflanzen können normal angezogen werden und mit Pflanzen, die die gleiche transformierte Erbanlage oder andere Erbanlagen besitzen, gekreuzt werden. Die daraus entstehenden hybriden Individuen haben die entsprechenden phänotypischen Merkmale.

Es sollten zwei oder mehrere Generationen angezogen werden, um sicherzustellen, daß das phänotypische Merkmal stabil beibehalten und vererbt wird. Auch sollten Samen geerntet werden, um sicherzustellen, daß der entsprechende Phänotyp oder andere Merkmale erhalten geblieben sind.

Ebenfalls ist ein weiterer Erfindungsgegenstand ein Verfahren zur Herstellung von Stärke in an sich bekannter Weise, worin erfindungsgemäße Pflanzenzellen, Pflanzen, Pflanzenteilen oder Vermehrungsmaterial verarbeitet bzw. in das Verfahren integriert werden.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder aus stärke-speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Verfahren zur Extraktion von Stärk aus

Maissamen sind z. B. in Eckhoff et al. (Cereal Chem. 73 (1996) 54-57) beschrieben. Die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das sogenannte "wet milling" erreicht. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen stärke-speichernden Pflanzen beschrieben, z. B. in "Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum-Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca-, Arrowroot- und Sagostärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Die erfindungsgemäßen transgenen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren aufgrund der Expression eines erfindungsgemäßen Nukleinsäuremoleküls eine Stärke, die beispielsweise in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist.

Noch ein weiterer Erfindungsgegenstand ist auch die Stärke, die aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle, Pflanze, deren Vermehrungsmaterial oder einem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich ist.

Zu einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zählt auch die industrielle Verwendung der erfindungsgemäßen Stärke zur Herstellung von Nahrungsmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.

Die erfindungsgemäße Stärke kann nach dem Fachmann bekannten Verfahren



modifiziert werden und eignet sich in unmodifizierter oder modifizierter Form für verschiedene Verwendungen im Nahrungsmittel- oder Nicht-Nahrungsmittelbereich.

Die Einsatzmöglichkeiten der erfindungsgemäßen Stärke lassen sich grundsätzlich in zwei große Bereiche unterteilen. Der eine Bereich umfaßt die Hydrolyseprodukte der Stärke, hauptsächlich Glukose und Glukosebausteine, die über enzymatische oder chemische Verfahren erhalten werden. Sie dienen als Ausgangsstoff für weitere chemische Modifikationen und Prozesse, wie Fermentation. Von Bedeutung kann hier die Einfachheit und kostengünstige Ausführung eines Hydrolyseverfahrens sein, wie es gegenwärtig im wesentlichen enzymatisch unter Verwendung von Amyloglukosidase verläuft. Vorstellbar wäre eine Kosteneinsparung durch einen geringeren Einsatz von Enzymen. Eine Strukturveränderung der Stärke, z.B. Oberflächenvergrößerung des Korns, leichtere Verdaulichkeit durch geringeren Verzweigungsgrad oder eine sterische Struktur, die die Zugänglichkeit für die eingesetzten Enzyme begrenzt, könnte dies bewirken.

Der andere Bereich, in dem die erfindungsgemäße Stärke wegen ihrer polymeren Struktur als sogenannte native Stärke verwendet werden kann, gliedert sich in zwei weitere Einsatzgebiete:

#### 1. Nahrungsmittelindustrie

Stärke ist ein klassischer Zusatzstoff für viele Nahrungsmittel, bei denen sie im wesentlichen die Funktion des Bindens von wäßrigen Zusatzstoffen übernimmt bzw. eine Erhöhung der Viskosität oder aber eine erhöhte Gelbildung hervorruft. Wichtige Eigenschaftsmerkmale sind das Fließ- und Sorptionsverhalten, die Quell- und Verkleisterungstemperatur, die Viskosität und Dickungsleistung, die Löslichkeit der Stärke, die Transparenz und Kleisterstruktur, die Hitze-, Scher- und Säurestabilität, die Neigung zur Retrogradation, die Fähigkeit zur Filmbildung, die Gefrier/Taustabilität, die Verdaulichkeit sowie die Fähigkeit zur Komplexbildung mit z.B. anorganischen oder organischen Ionen.

## 2. Nicht-Nahrungsmittelindustrie

In diesem großen Bereich wird Stärke als Hilfsstoff für unterschiedliche Herstellungsprozesse bzw. als Zusatzstoff in technischen Produkten eingesetzt. Bei der Verwendung von Stärke als Hilfsstoff ist hier insbesondere die Papier- und Pappeindustrie zu nennen. Stärke dient dabei in erster Linie zur Retardation (Zurückhaltung von Feststoffen), der Abbindung von Füllstoff- und Feinstoffteilchen, als Festigungsstoff und zur Entwässerung. Darüber hinaus werden die günstigen Eigenschaften der Stärke in bezug auf die Steifigkeit, die Härte, den Klang, den Griff, den Glanz, die Glätte, die Spaltfestigkeit sowie die Oberflächen ausgenutzt.

### 2.1. Papier- und Pappeindustrie

Innerhalb des Papierherstellungsprozesses sind vier Anwendungsbereiche, nämlich Oberfläche, Strich, Masse und Sprühen, zu unterscheiden. Auf die Oberflächenstärk entfällt mit 80 % des Verbrauchs die mit Abstand größte Stärkemenge, 8 % werden als Strichstärke, 7 % als Massestärke und 5 % als Sprühstärke eingesetzt.

Die Anforderungen an die Stärke in bezug auf die Oberflächenbehandlung sind im wesentlichen ein hoher Weißegrad, eine angepaßte Viskosität, eine hohe Viskositätsstabilität, eine gute Filmbildung sowie eine geringe Staubbildung. Bei der Verwendung im Strich spielt der Feststoffgehalt, eine angepaßte Viskosität, ein hohes Bindevermögen sowie eine hohe Pigmentaffinität eine wichtige Rolle. Als Zusatz zur Masse ist eine rasche, gleichmäßige, verlustfreie Verteilung, eine hohe mechanische Stabilität und eine vollständige Zurückhaltung im Papierfließ von Bedeutung. Beim Einsatz der Stärke im Sprühbereich sind ebenfalls ein angepaßter Feststoffgehalt, hohe Viskosität sowie ein hohes Bindevermögen von Bedeutung.

### 2.2. Klebstoffindustrie

Ein großer Einsatzbereich von Stärken besteht in der Klebstoffindustrie, wo man die Einsatzmöglichkeiten in vier Teilbereiche gliedert: die Verwendung als reinem Stärkeleim, die Verwendung bei mit speziellen Chemikalien aufbereiteten

Stärkeleimen, die Verwendung von Stärke als Zusatz zu synthetischen Harzen und Polymerdispersionen sowie die Verwendung von Stärken als Streckmittel für synthetische Klebstoffe. 90 % der Klebstoffe auf Stärkebasis werden in den Bereichen Wellpappenherstellung, Herstellung von Papiersäcken, Beuteln und Tüten, Herstellung von Verbundmaterialien für Papier und Aluminium, Herstellung von Kartonagen und Wiederbefeuchtungsleim für Briefumschläge, Briefmarken usw. eingesetzt.

### 2.3. Textil- und Textilpflegemittelindustrie

Ein großes Einsatzfeld für Stärken als Hilfsmittel und Zusatzstoff ist der Bereich Herstellung von Textilien und Textilpflegemitteln. Innerhalb der Textilindustrie sind die folgenden vier Einsatzbereiche zu unterscheiden: Der Einsatz der Stärke als Schlichtmittel, d.h. als Hilfsmittel zur Glättung und Stärkung des Klettverhaltens zum Schutz gegen die beim Weben angreifenden Zugkräfte sowie zur Erhöhung der Abriebfestigkeit beim Weben, Stärke als Mittel zur Textilaufrüstung vor allem nach qualitätsverschlechternden Vorbehandlungen, wie Bleichen, Färben usw., Stärke als Verdickungsmittel bei der Herstellung von Farbpasten zur Verhinderung von Farbstoffdiffusionen sowie Stärke als Zusatz zu Kettungsmitteln für Nähgarne.

### 2.4. Baustoffindustrie

Der vierte Einsatzbereich ist die Verwendung von Stärken als Zusatz bei Baustoffen. Ein Beispiel ist die Herstellung von Gipskartonplatten, bei der die im Gipsbrei vermischte Stärke mit dem Wasser verkleistert, an die Oberfläche der Gipsplatte diffundiert und dort den Karton an die Platte bindet. Weitere Einsatzbereiche sind die Beimischung zu Putz- und Mineralfasern. Bei Transportbeton werden Stärkeprodukte zur Verzögerung der Abbindung eingesetzt.

### 2.5. Bodenstabilisation

Ein mengenmäßig begrenzter Markt für Stärkeprodukte bietet sich bei der Herstellung von Mitteln zur Bodenstabilisation an, die bei künstlichen Erdbewegungen zum

temporären Schutz der Bodenpartikel gegenüber Wasser eingesetzt werden. Kombinationsprodukte aus Stärke und Polymeremulsionen sind nach heutiger Kenntnis in ihrer Erosions- und verkrustungsmindernden Wirkung den bisher eingesetzten Produkten gleichzusetzen, liegen preislich aber deutlich unter diesen.

#### 2.6. Einsatz bei Pflanzenschutz- und Düngemitteln

Ein Einsatzbereich liegt bei der Verwendung der Stärke in Pflanzenschutzmitteln zur Veränderung der spezifischen Eigenschaften der Präparate. So werden Stärken zur Verbesserung der Benetzung von Pflanzenschutz- und Düngemitteln, zur dosierten Freigabe der Wirkstoffe, zur Umwandlung flüssiger, flüchtiger und/oder übelriechender Wirkstoffe in mikrokristalline, stabile, formbare Substanzen, zur Mischung inkompatibler Verbindungen und zur Verlängerung der Wirkdauer durch Verminderung der Zersetzung eingesetzt.

#### 2.7. Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie

Ein weiteres Einsatzgebiet besteht im Bereich der Pharmaka, Medizin und Kosmetikindustrie. In der pharmazeutischen Industrie werden Stärken als Bindemittel für Tabletten oder zur Bindemittelverdünnung in Kapseln eingesetzt. Weiterhin dienen Stärken als Tablettensprengmittel, da sie nach dem Schlucken Flüssigkeit absorbieren und nach kurzer Zeit soweit quellen, daß der Wirkstoff freigesetzt wird. Medizinische Gleit- und Wundpuder basieren aus qualitativen Gründen auf Stärke. Im Bereich der Kosmetik werden Stärken beispielsweise als Träger von Puderzusatzstoffen, wie Düften und Salicylsäure eingesetzt. Ein relativ großer Anwendungsbereich für Stärke liegt bei Zahnpasta.

#### 2.8. Stärkezusatz zu Kohle und Brikett

Einen Einsatzbereich bietet die Stärke als Zusatzstoff zu Kohle und Brikett. Kohle kann mit einem Stärkezusatz quantitativ hochwertig agglomeriert bzw. brikettiert werden, wodurch ein frühzeitiges Zerfallen der Briketts verhindert wird. Der Stärkezusatz liegt bei Grillkohle zwischen 4 und 6 %, bei kalorierter Kohle zwischen

0,1 und 0,5 %. Des weiteren gewinnen Stärken als Bindemittel an Bedeutung, da durch ihren Zusatz zu Kohle und Brikett der Ausstoß schädlicher Stoffe deutlich vermindert werden kann.

#### 2.9. Erz- und Kohleschlammaufbereitung

Stärke kann ferner bei der Erz- und Kohleschlammaufbereitung als Flockungsmittel eingesetzt werden.

#### 2.10. Gießereihilfsstoff

Ein weiterer Einsatzbereich besteht als Zusatz zu Gießereihilfsstoffen. Bei verschiedenen Gußverfahren werden Kerne benötigt, die aus Bindemittel-versetzten Sänden hergestellt werden. Als Bindemittel wird heute überwiegend Bentonit eingesetzt, das mit modifizierten Stärken, meist Quellstärken, versetzt ist. Zweck des Stärkezusatzes ist die Erhöhung der Fließfestigkeit sowie die Verbesserung der Bindefestigkeit. Darüber hinaus können die Quellstärken weitere produktionstechnische Anforderungen, wie im kalten Wasser dispergierbar, rehydratisierbar, gut in Sand mischbar und hohes Wasserbindungsvermögen, aufweisen.

#### 2.11. Einsatz in der Kautschukindustrie

In der Kautschukindustrie wird Stärke zur Verbesserung der technischen und optischen Qualität eingesetzt. Gründe sind dabei die Verbesserung des Oberflächenglanzes, die Verbesserung des Griffs und des Aussehens, dafür wird Stärke vor der Kaltvulkanisation auf die klebrigen gummierten Flächen von Kautschukstoffen gestreut, sowie die Verbesserung der Bedruckbarkeit des Kautschuks.

#### 2.12. Herstellung von Lederersatzstoffen

Eine weitere Absatzmöglichkeit von modifizierten Stärken besteht bei der Herstellung von Lederersatzstoffen.

### 2.13. Stärke in synthetischen Polymeren.

Auf dem Kunststoffsektor zeichnen sich folgende Einsatzgebiete ab: die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in den Verarbeitungsprozess (Stärke ist nur Füllstoff, es besteht keine direkte Bindung zwischen synthetischem Polymer und Stärke) oder alternativ die Einbindung von Stärkefolgeprodukten in die Herstellung von Polymeren (Stärke und Polymer gehen eine feste Bindung ein).

Die Verwendung von Stärke als reinem Füllstoff ist verglichen mit den anderen Stoffen wie Talkum nicht wettbewerbsfähig. Anders sieht es aus, wenn die spezifischen Stärkeeigenschaften zum Tragen kommen und hierdurch das Eigenschaftsprofil der Endprodukte deutlich verändert wird. Ein Beispiel hierfür ist die Anwendung von Stärkeprodukten bei der Verarbeitung von Thermoplasten, wie Polyäthylen. Hierbei werden die Stärke und das synthetische Polymer durch Koexpression im Verhältnis von 1 : 1 zu einem 'master batch' kombiniert, aus dem mit granuliertem Polyäthylen unter Anwendung herkömmlicher Verfahrenstechniken diverse Produkte hergestellt werden. Durch die Einbindung von Stärke in Polyäthylenfolien kann eine erhöhte Stoffdurchlässigkeit bei Hohlkörpern, eine verbesserte Wasserdampfdurchlässigkeit, ein verbessertes Antistatikverhalten, ein verbessertes Antiblockverhalten sowie eine verbesserte Bedruckbarkeit mit wässrigen Farben erreicht werden. Gegenwärtige Nachteile betreffen die ungenügende Transparenz, die verringerte Zugfestigkeit sowie eine verringerte Dehnbarkeit.

Eine andere Möglichkeit ist die Anwendung von Stärke in Polyurethanschäumen. Mit der Adaption der Stärkederivate sowie durch die verfahrenstechnische Optimierung ist es möglich, die Reaktion zwischen synthetischen Polymeren und den Hydroxygruppen der Stärken gezielt zu steuern. Das Ergebnis sind Polyurethanfolien, die durch die Anwendung von Stärke folgende Eigenschaftsprofile erhalten: eine Verringerung des Wärmeausdehnungskoeffizienten, Verringerung des Schrumpfverhaltens, Verbesserung des Druck/Spannungsverhaltens, Zunahme der

Wasserdampfdurchlässigkeit ohne Veränderung der Wasseraufnahme, Verringerung der Entflammbarkeit und der Aufrißdichte, kein Abtropfen brennbarer Teile, Halogenfreiheit und verminderte Alterung. Nachteile, die gegenwärtig noch vorhanden sind, sind verringerte Druckfestigkeit sowie eine verringerte Schlagfestigkeit.

Die Produktentwicklung beschränkt sich inzwischen nicht mehr nur auf Folien. Auch feste Kunststoffprodukte, wie Töpfe, Platten und Schalen, sind mit einem Stärkegehalt von über 50 % herzustellen. Des weiteren sind Stärke/Polymermischungen günstig zu beurteilen, da sie eine sehr viel höhere biologische Abbaubarkeit aufweisen.

Außerordentliche Bedeutung haben weiterhin auf Grund ihres extremen Wasserbindungsvermögen Stärkepfropfpolymerisate gewonnen. Dies sind Produkte mit einem Rückgrat aus Stärke und einer nach dem Prinzip des Radikalkettenmechanismus aufgepfropften Seitengitters eines synthetischen Monomers. Die heute verfügbaren Stärkepfropfpolymerisate zeichnen sich durch ein besseres Binde- und Rückhaltevermögen von bis zu 1000 g Wasser pro g Stärke bei hoher Viskosität aus. Die Anwendungsbereiche für diese Superabsorber haben sich in den letzten Jahren stark ausgeweitet und liegen im Hygienebereich mit Produkten Windeln und Unterlagen sowie im landwirtschaftlichen Sektor, z.B. bei Saatgutpillierungen.

Entscheidend für den Einsatz von neuen, gentechnisch veränderten Stärken sind zum einen die Struktur, Wassergehalt, Proteingehalt, Lipidgehalt, Fasergehalt, Asche/Phosphatgehalt, Amylose/Amylopektinverhältnis, Molmassenverteilung, Verzweigungsgrad, Korngröße und -form sowie Kristallisation, zum anderen auch die Eigenschaften, die in folgende Merkmale münden: Fließ- und Sorptionsverhalten, Verkleisterungstemperatur, Viskosität, Dickungsleistung, Löslichkeit, Kleisterstruktur, Transparenz, Hitze-, Scher- und Säurestabilität, Retrogradationsneigung, Gelbildung, Gefrier/Taustabilität, Komplexbildung, Jodbindung, Filmbildung, Klebekraft,

Enzymstabilität, Verdaulichkeit und Reaktivität.

Die Erzeugung modifizierter Stärken mittels gentechnischer Verfahren kann zum einen die Eigenschaften der z.B. aus der Pflanze gewonnenen Stärke dahingehend verändern, daß weitere Modifikationen mittels chemischer oder physikalischer Veränderungen nicht mehr notwendig erscheinen. Zum anderen können jedoch auch durch gentechnische Verfahren veränderte Stärken weiteren chemischen Modifikationen unterworfen werden, was zu weiteren Verbesserungen der Qualität für bestimmte der oben beschriebenen Einsatzgebiete führt. Diese chemischen Modifikationen sind grundsätzlich bekannt. Insbesondere handelt es sich dabei um Modifikationen durch Hitze- und Druckbehandlung, Behandlung mit organischen oder anorganischen Säuren, enzymatische Behandlung, Oxidationen und Veresterungen, welche z.B. zur Entstehung von Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- und Citratstärken führen. Desweiteren können ein- oder mehrwertige Alkohole in Gegenwart starker Säuren zur Erzeugung von Stärkeethern eingesetzt werden, so daß Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, N-haltige Stärkeether, P-haltige Stärkeether, S-haltige Stärkeether, vernetzte Stärken oder Stärke-Pfropf-Polymerisate resultieren.

Eine Verwendung der erfindungsgemäßen Stärken liegt in der industriellen Anwendung, vorzugsweise für Lebensmittel oder der Herstellung von Verpackungsmaterialien und Einwegartikeln.

Die nachfolgenden Beispiele dienen der Illustrierung der Erfindung und stellen in keiner Weise eine Einschränkung dar.

Verwendete Abkürzungen:

BE	branching enzyme (Verzweigungsenzym)
bp	Basenpaar



<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ -D-Thiogalacto-Pyranosid
<b>SS</b>	soluble starch synthase (lösliche Stärkesynthase)
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid

**In den Beispielen verwendete Medien und Lösungen:**

<b>20 x SSC</b>	175,3 g NaCl 88,2 g Natrium-Citrat ad 1000 ml mit ddH <sub>2</sub> O pH 7,0 mit 10 N NaOH
<b>Puffer A</b>	50 mM Tris-HCl pH 8,0 2,5 mM DTT 2 mM EDTA 0,4 mM PMSF 10% Glycerin 0,1 % Natriumdithionit
<b>Puffer B</b>	50 mM Tris-HCl pH 7,6 2,5 mM DTT 2 mM EDTA
<b>Puffer C</b>	0,5 M Natriumcitrat pH 7,6 50 mM Tris-HCl pH 7,6 2,5 mM DTT 2 mM EDTA
<b>10 x TBS</b>	0,2 M Tris-HCl pH 7,5 5,0 M NaCl

10 x TBST	10 x TBS 0,1 % (v/v) Tween 20
Elutionspuffer	25 mM Tris pH 8,3 250 mM Glycin
Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,0 50 mM NaCl 2 mM EDTA 14,7 mM $\beta$ -Mercaptoethanol 0,5 mM PMSF
Proteinpuffer	50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,2 10 mM EDTA 0,5 mM PMSF 14,7 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

#### Beschreibung der Abbildungen:

Fig. 1 stellt ein schematisches RVA-Temperaturprofil (Viskosität vs. Zeit [min]) dar mit den viskosimetrischen Parametern T = Verkleisterungstemperatur, Temperatur zum Zeitpunkt des Verkleisterungsbeginns; Max bezeichnet die maximale Viskosität; Min bezeichnet die minimale Viskosität; Fin bezeichnet die Viskosität am Ende der Messung; Set ist die Differenz ( $\Delta$ ) aus Min und Fin (Setback).

In den Beispielen wurden die folgenden Methoden verwendet:

#### 1. Klonierungsverfahren

Zur Klonierung in *E. coli* wurde der Vektor pBluescript II SK (Stratag ne) verw ndet.

Für die Pflanz ntransformation wurden die Genkonstruktionen in den binären Vektor pBinAR Hyg (Höfgen & Willmitzer, 1990; Plant Sci. 66:221-230) und pBinB33-Hyg kloniert.

## 2. Bakterienstämme und Plasmide

Für den Bluescript-Vektor p Bluescript II KS (Stratagene) und für die pBinAR Hyg- und pBinB33 Hyg-Konstrukte wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburgh, USA) verwendet. Für die *in vivo excision* wurde der *E. coli*-Stamm XL1-Blue verwendet.

### pBinAR

Das Plasmid pBinAR ist ein Derivat des binären Vektorplasmids pBin19 (Bevan, 1984, Nucl. Acid Res. 12:8711-8721), das folgendermaßen konstruiert wurde: Ein 529 bp langes Fragment, das die Nukleotide 6909-7437 des 35S-Promotor des Blumenkohl-Mosaik-Virus umfaßt, wurde als EcoRI/KpnI-Fragment aus dem Plasmid pDH51 (Pietrzak et al., 1986) isoliert und zwischen die EcoRI- und KpnI-Schnittstellen des Polylinkers von pUC18 ligiert und wurde Plasmid pUC18-35S bezeichnet. Aus dem Plasmid pAGV40 (Herrera-Estrella et al., 1983) wurde mit Hilfe der Restriktionsendonucleasen HindIII und PvuII ein 192 bp langes Fragment isoliert, DNA des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al, 1984, EMBO J. :835-846) umfaßt (Nukleotide 11749-11939). Nach Addition von SphI-Linkern an die PvuII-Schnittstelle wurde das Fragment zwischen die SphI- und HindIII-Schnittstellen von pUC18-35S ligiert und wurde Plasmid pA7 bezeichnet. Desweiteren wurde der gesamte Polylinker enthaltend den 35S-Promotor und ocs-Terminator mit EcoRI und HindIII herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen pBin19 ligiert. Dabei entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990).

### pBinB33

Der Promotor des Patatin Gens B33 aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) wurde als DraI-Fragment (Nukleotide -1512 - +14) in den mit Sst I

geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der T4-DNA Polymerase geglättet worden waren, ligiert. Daraus entstand das Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit EcoRI und SmaI herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

#### pBinAR-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pA7 (vgl. Beschreibung des Vektors pBinAR) wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den 35S-Promotor, den ocs-Terminator sowie den zwischen 35S-Promotor und ocs-Terminator gelegenen Teil des Polylinker in das entsprechend geschnittene pBin-Hyg Plasmid gesetzt.

#### pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das EcoRI-HindIII Fragment umfassend den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den ocs-Terminator herausgeschnittenen und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBin-Hyg ligiert. Hieraus entstand der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33-Hyg.

### 3. Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Der Transfer der DNA erfolgte durch direkte Transformation nach der Methode von Höfgen&Willmitzer (1988, Nucleic Acids Res. 16:9877). Die Plasmid-DNA transformierter Agrobakterien wurde nach der Methode von Birnboim&Doly (1979, Nucleic Acids Res. 7:1513-1523) isoliert und nach geeigneter Restriktionsspaltung gelelektrophoretisch analysiert.

### 4. Transformation von Kartoffeln

Die Transformation der Plasmide in die Kartoffelpflanzen (*Solanum tuberosum* L.cv. Desiree, Vereinigte Saatuchten eG, Ebstorf) wurde mit Hilfe des *Agrobacterium tumefaciens*-Stammes C58C1 durchgeführt (Dietze et al. (1995) in Gene Transfer to Plants. S. 24-29, eds.: Potrykus, I. and Spangenberg, G., Springer Verlag, Deblaer

et al., 1985, Nucl. Acids Res. 13:4777-4788).

Zehn kleine mit dem Skalpell verwundete Blätter einer Kartoffel-Sterilkultur wurden in 10 ml MS-Medium (Murashige&Skoog (1962) Physiol. Plant. 15: 473) mit 2% Saccharose gelegt, welches 50 ml einer unter Selektion gewachsenen *Agrobacterium tumefaciens*-Übernachtskultur enthielt. Nach 3-5 minütigem, leichtem Schütteln erfolgte eine weitere Inkubation für 2 Tage im Dunkeln. Daraufhin wurden die Blätter zur Kallusinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 5 mg/l Naphthylessigsäure, 0,2 mg/l Benzylaminopurin, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt. Nach einwöchiger Inkubation bei 25°C und 3000 Lux wurden die Blätter zur Sproßinduktion auf MS-Medium mit 1,6% Glukose, 1,4 mg/l Zeatinribose, 20 mg/l Naphthylessigsäure, 20 mg/l Giberellinsäure, 250 mg/l Claforan, 50 mg/l Kanamycin, und 0,80.% Bacto Agar gelegt.

#### 5. Pflanzenhaltung

Kartoffelpflanzen wurden im Gewächshaus unter folgenden Bedingungen gehalten:

Lichtperiode            16 h bei 25000 Lux und 22°C

Dunkelperiode        8 h bei 15°C

Luftfeuchte            60 %

#### 6. Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Die radiokative Markierung von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe eines DNA-Random Primer Labelling Kits der Firma Boehringer Mannheim (Deutschland) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 7. Bestimmung der Stärkesynthase-Aktivität

Die Bestimmung der Stärkesynthaseaktivität erfolgte durch Bestimmung des Einbaus von <sup>14</sup> C-Glukose aus ADP [<sup>14</sup> C-Glukose] in ein in Methanol/KCl unlösliches Produkt wie beschrieben in Denyer & Smith, 1992, Planta 186:609-617.

### 8. Nachweis von löslichen Stärkesynthasen im nativen Gel

Zum Nachweis der Aktivität löslicher Stärkesynthasen durch nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurden Gewebeproben von Kartoffelknollen in 50 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM DTT, 2,5 mM EDTA, 10 % Glycerin und 0,4 mM PMSF aufgeschlossen. Die Elektrophorese wurde in einer MiniProtean II Kammer (BioRAD) durchgeführt. Die Monomerkonzentration der 1,5 mm dicken Gele war 7,5 % (w/v), als Gel- und Laufpuffer diente 25 mM Tris-Glycin pH 8,4. Gleiche Mengen an Proteinextrakt wurden aufgetragen und für 2 h bei 10 mA je Gel aufgetrennt.

Anschließend erfolgte die Inkubation der Aktivitäts-Gele in 50 mM Tricine-NaOH pH 8,5, 25 mM Kaliumacetat, 2 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM ADP-Glukose, 0,1 % (w/v) Amylopektin und 0,5 M Natriumcitrat. Gebildete Glukane wurden mit Lugolscher Lösung angefärbt.

### 9. Stärkeanalytik

Die von den transgenen Kartoffelpflanzen gebildete Stärke wurde durch folgende Methoden charakterisiert:

#### a) Bestimmung des Amylose/Amylopektinverhältnisses in Stärke aus Kartoffelpflanzen

Stärke wurde nach Standardmethoden aus Kartoffelpflanzen isoliert und das Verhältnis Amylose zu Amylopektin nach der von Hovenkamp-Hermelink et al. beschriebenen Methode (Potato Research 31 (1988) 241-246) bestimmt.

#### b) Bestimmung des Phosphatgehaltes

In der Kartoffelstärke können einige Glucoseeinheiten an den Kohlenstoffatomen der Position C2, C3 und C6 phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades an der C6-Position der Glucose wurden 100 mg Stärke in 1 ml 0,7 M HCl für 4 Stunden bei 95°C hydrolysiert (Nielsen et. al. (1994) Plant Physiol. 105: 111-117). Nach Neutralisation mit 0,7 M KOH wurden zur Glucose-6-phosphat-Bestimmung 50 ml des Hydrolysats einem optisch-enzymatischen Test

unterzogen. Die Änderung der Absorption des Testansatzes (100 mM Imidazol/HCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,4 mM NAD; 2 U Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*; 30°C) wurde bei 334 nm verfolgt.

Die Bestimmung des Gesamtphosphats erfolgte wie in Ames, 1996, Methods in Enzymology VIII, 115-118 beschrieben.

c) Analyse der Seitenketten des Amylopektins

Zur Analyse der Verteilung und Länge der Seitenketten in den Stärkeproben wurde 1 ml einer 0,1 %igen Stärkelösung mit 0,4 U Isoamylase (Megazyme International Ireland Ltd., Bray, Ireland) über Nacht bei 37°C in 100 mM Na-citrat-Puffer, pH 3,5 verdaut.

Die weitere Analyse erfolgte, sofern nicht anders erwähnt, entsprechend den Angaben von Tomlinson et al., (1997), Plant J. 11:31-47.

d) Korngrößenbestimmung

Die Korngrößenbestimmung wurde mit einem Fotosedimentometer des Typs "Lumosed" der Firma Retsch GmbH, Deutschland, durchgeführt. Hierfür wurden 0.2 g Stärke in ca. 150 ml Wasser suspendiert und sofort vermessen. Das vom Hersteller mitgelieferte Programm berechnete den mittleren Durchmesser der Stärkekörner auf der Annahme einer durchschnittlichen Dichte der Stärke von 1,5 g/l.

e) Verkleisterungseigenschaften

Die Verkleisterungs- bzw. Viskositätseigenschaften der Stärke wurden mit einem Viskograph E der Firma Brabender oHG, Deutschland, oder mit einem Rapid Visco Analyser, Newport Scientific Pty Ltd, Investment Support Group, Warriewood NSW 2102, Australien, aufgezeichnet. Bei Verwendung des Viskographen E wurde eine Suspension von 30 g Stärke in 450 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen:

aufheizen von 50°C auf 96°C mit 3°/min., 30 Minuten konstant halten, abkühlen auf 30°C mit 3°/min. und abermals 30 Minuten konstant halten. Das Temperaturprofil lieferte charakteristische Verkleisterungseigenschaften.

Bei der Messung mittels des Rapid Visco Analysers (RVA) wurde eine Suspension von 2 g Stärke in 25 ml Wasser folgendem Heizprogramm unterzogen: 60 s bei 50°C suspendieren, aufheizen von 50°C auf 95°C mit 12°/min., 2,5 Minuten konstant halten, abkühlen auf 50°C mit 12°C/min. und abermals 2 Minuten konstant halten. Das RVA-Temperaturprofil lieferte die viskosimetrischen Parameter der untersuchten Stärken für die maximale (Max) und Endviskosität (Fin), die Verkleisterungstemperatur (T), die nach der maximalen Viskosität auftretende minimale Viskosität (Min) sowie die Differenz aus minimaler und Endviskosität (Setback, Set) (vgl. Tabelle 1 und Fig. 1).

#### f) Bestimmung der Gelfestigkeit

Zur Bestimmung der Gelfestigkeit mittels eines Texture Analyser wurden 2 g Stärke in 25 ml Wasser verkleistert (vgl. Messung mittels RVA) und anschließend 24 h lang bei 25°C luftdicht verschlossen gelagert. Die Proben wurden unter der Sonde (runder Stempel) eines Texture Analysers TA-XT2 (Stable Micro Systems) fixiert und die Gelfestigkeit mit folgenden Parameter-Einstellungen bestimmt:

Test-Geschwindigkeit	0,5 mm
Eindringtiefe	7 mm
Kontaktfläche (des Stempels)	113 mm <sup>2</sup>
Druck/Kontaktfläche	2 g

#### 10. Bestimmung von Glucose, Fructose und Saccharose

Zur Bestimmung des Glucose-, Fructose- bzw. Saccharosegehalts wurden kleine Knollenstücke (Durchmesser ca. 10 mm) von Kartoffelknollen in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 30 min bei 80°C in 0,5 ml 10 mM HEPES, pH 7,5;



80 % (v/v) Ethanol extrahiert. Der Überstand, der die löslichen Bestandteile enthält, wurde abgenommen und das Volumen bestimmt. Der Überstand wurde zur Bestimmung der Menge an löslichen Zuckern verwendet. Die quantitative Bestimmung von löslicher Glucose, Fructose und Saccharose wurde in einem Ansatz mit folgender Zusammensetzung durchgeführt.

100,0	mM Imidazol/HCl, pH 6,9
1,5	mM MgCl <sub>2</sub>
0,5	mM NADP <sup>+</sup>
1,3	mM ATP
10-50	μl Probe
1,0	U Glucose-6-Phosphatdehydrogenase aus Hefe

Der Ansatz wurde 5 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der Zucker erfolgt anschließend photometrisch durch Messung der Absorption bei 340 nm nach aufeinanderfolgender Zugabe von

1,0 Einheiten Hexokinase aus Hefe (zur Bestimmung von Glucose),  
1,0 Einheiten Phosphoglucisomerase aus Hefe (zur Bestimmung von Fructose) und  
1,0 Einheiten Invertase aus Hefe (zur Bestimmung von Saccharose).

#### Ausführungsbeispiele:

##### Beispiel 1: Isolierung eines cDNA-Fragments kodierend für $\beta$ -Amylase aus Kartoffel

Etwa  $6 \times 10^6$  Plaque forming Units (pfU's) einer Knollen-spezifischen cDNA-Bibliothek aus Kartoffel ( $\lambda$ ZAP II, Stratagene) wurden nach Herstellerangaben (Stratagene) in vivo excisiert und ein Teil des Phagmidstocks zur Transfektion von E.coli XL1-MRF-Zellen (nach Herstellerangaben) verwendet. Plasmid-DNA von etwa  $5 \times 10^5$  solcher E.coli-Transformanten wurde präpariert (Sambrook et al., 1989, loc.cit.) und zur Transformation nach der Elektroporationsmethode (BioRAD, nach Angaben des Herstellers) von Zellen des E.coli-Stammes KV832/pACAG (Abel, G., 1995,

Dissertation am FB Biologie der FU Berlin) verwendet.

Die KV832/pACAG-Transformanten wurden auf YT-Medium (5g/l NaCl, 8g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt) mit 1 % Glukose und 1 mM IPTG bei 37°C kultiviert. Zur Selektion auf das Vorhandensein des Plasmids pACAG enthielt das Medium 10 mg/l Chloramphenicol. Zur Selektion auf positive Transformanten enthielt das Medium 100 mg/l Ampicillin.

Nach etwa 14 Stunden Wachstum wurden die Kolonien der transformierten Zellen über Jod-Dampf gefärbt. Plasmid-DNA deutlich schwach gefärbter Kolonien wurde nach Birnboim & Doly (1979) präpariert und zur Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  (Sambrook et al., 1989, loc.cit.) verwendet. Plasmid DNA dieser Transformanten wurde zur DNA-Sequenzierung eingesetzt und als Seq. ID Nr. 1 identifiziert.

Das auf diese Weise selektierte Plasmid wurde am 24.07.98 unter der Nummer DSM 12348 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Braunschweig, BRD, hinterlegt und enthält zwischen dem CAMV 35S-Promotor und dem ocs-Terminator ein ca. 1300 bp langes Asp718/BamH1-Fragment der als Seq. ID Nr. 1 dargestellten Nukleotidsequenz, kodierend für eine  $\beta$ -Amylase aus *Solanum tuberosum*.

**Beispiel 2:** Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSI-Hyg

Ein 1831 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SSS I aus Kartoffel (Abel, G., (1995) Dissertation, Freie Universität Berlin), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

**Beispiel 3:** Herstellung des Plasmids p35S-SSI-Kan

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus

Kartoffel, (Abel 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in dem mit SmaI vorgeschnittenen Vektor pBinAR in "sense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors eingeführt.

**Beispiel 4: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Kan**

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, dort als GBSS II bezeichnet), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

**Beispiel 5: Herstellung des Plasmids pB33-SSII-Hyg**

Ein 2619 bp langes SmaI/SalI Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den mit SmaI und SalI vorgeschnittenen Vektor pBinB33-Hyg in "sense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 6: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSIII-Hyg**

Ein 4212 bp langes Asp718/XbaI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, Plant J. 10(6):981-991), wurde in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors zwischen die Asp718- und die XbaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR-Hyg eingeführt.

**Beispiel 7: Herstellung des Plasmids p35S-SSIII-Kan**

Ein 4191 bp langes EcoRI-Fragment, enthaltend eine cDNA kodierend für SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), wurde geglättet und in "sense"-Orientierung

bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des Vektors pBinAR eingeführt.

**Beispiel 8: Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ BE $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 1650 bp langes HindII-Fragment, welches eine partielle cDNA kodierend für das BE-Enzym aus Kartoffel enthält (Kossmann et al., 1991, Mol. & Gen. Genetics 230(1-2):39-44), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33 Promotors in den mit SmaI vorgeschrittenen Vektor pBinB33 eingeführt. Das erhaltene Plasmid wurde mit BamHI aufgeschnitten. In die Schnittstelle wurde ein 1362 Bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für das SS III-Enzym aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 9: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII- $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 1546 bp langes EcoRV/HincII-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.), wurde in den EcoRV/HincII-geschnittenen Vektor pBluescript II KS kloniert und anschließend über einen Asp718/BamHI-Verdau wieder herausgeschnitten und in den ebenso verdauten Vektor pBinAR in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors eingefügt. Danach wurde ein 1356 Bp langes BamHI-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.), ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die BamHI-Schnittstelle des Vektors pBinAR- $\alpha$ SSII eingeführt.

**Beispiel 10: Herstellung des Plasmids pB33 $\alpha$ SSI $\alpha$ SSIII-Kan**

Ein 2384 bp langes EcoRI-Fragment enthaltend eine cDNA kodierend für SS I aus Kartoffel (Abel, 1995, loc.cit.) wurde geglättet und in die SmaI-Schnittstelle des

pBinB33-Vektors in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors kloniert. Ein 1362 Bp langes BamHI-Fragment enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS III aus Kartoffel (Abel et al., 1996, loc.cit.) wurde in die BamHI-Schnittstelle des resultierenden Vektors ebenfalls in "antisense"-Orientierung bezüglich des B33-Promotors eingeführt.

**Beispiel 11: Herstellung des Plasmids p35S $\alpha$ SSII-Hyg**

Ein 1959 bp langes SmaI/Asp718-Fragment, enthaltend eine partielle cDNA kodierend für die SS II (Abel, 1995, loc.cit.), wurde geglättet und in "antisense"-Orientierung bezüglich des 35S-Promotors in die SmaI-Schnittstelle des pBinAR-Hyg-Vektors eingeführt.

**Beispiel 12: Einführung der Plasmide in das Genom von Kartoffelzellen**

Die in Beispiel 1 bis 11 aufgeführten Plasmide wurden einzeln und/oder aufeinanderfolgend in Agrobakterien transferiert, mit deren Hilfe die Transformation von Kartoffelzellen wie oben beschrieben vorgenommen wurde. Aus den transformierten Pflanzenzellen wurden anschließend ganze Pflanzen regeneriert.

**Beispiel 13: Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften der modifizierten Stärken**

Als Ergebnis der Transformation zeigten die transgenen Kartoffelpflanzen eine Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften der von ihnen synthetisierten Stärken. Die von diesen Pflanzen gebildete Stärke unterscheidet sich z.B. von in Wildtyppflanzen synthetisierter Stärke in ihrem Phosphat- oder Amylosegehalt, den mittels RVA bestimmten Viskositäts- oder Verkleisterungseigenschaften sowie ihrem chromatographischen Verhalten.


BUDAPESTER VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE  
ANERKENNUNG DER HINTERLEGUNG VON MIKROORGANISMEN  
FÜR DIE ZWECKE VON PATENTVERFAHREN

Höchst Schering  
AgrEvo GmbH

INTERNATIONALES FORMBLATT

65926 Frankfurt am Main

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,  
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen  
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

<b>I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS</b>	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: <b>St-<math>\beta</math>-Amy</b>	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER:  <b>DSM 12348</b>
<b>II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG</b>	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>( ) eine wissenschaftliche Beschreibung</p> <p>(X) eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
<b>III. EINGANG UND ANNAHME</b>	
<p>Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am <b>1998-07-24</b> (Datum der Ersthinterlegung)<sup>1</sup> eingegangen ist.</p>	
<b>IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG</b>	
<p>Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).</p>	
<b>V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE</b>	
<p>Name: <b>DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH</b></p> <p>Anschrift: <b>Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig</b></p>	<p>Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:</p> <p></p> <p>Datum: <b>1998-07-30</b></p>

<sup>1</sup> Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

**Patentansprüche:**

1. Nukleinsäuremolekül, codierend ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
  - a) Nukleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die unter Seq ID NO. 2 angegebene Aminosäuresequenz umfaßt oder deren Derivate oder Teile,
  - b) Nukleinsäuremolekülen, die die unter Seq ID No. 1 dargestellte Nucleotidsequenz oder deren Derivate oder Teile umfassen oder eine korrespondierende Ribonucleotidsequenz;
  - c) Nukleinsäuremoleküle, die mit den unter (a) oder (b) genannten Nukleinsäuremolekülen hybridisieren, vorzugsweise spezifisch hybridisieren oder komplementär sind, und
  - d) Nukleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter (a), (b) oder (c) genannten Nukleinsäuremoleküle abweicht.
2. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, enthaltend
  - a) ein Nukleinsäuremolekül codierend für ein Protein mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase aus Kartoffel gemäß Anspruch 1 und
  - b) ein oder mehrere Nukleotidsequenzen, die für ein Protein kodieren, ausgewählt aus der Gruppe A, bestehend aus Proteinen mit der Funktion von Verzweigungsenzymen, ADP-Glukose-Pyrophosphorylasen, Stärke-korn-gebundenen Stärkesynthasen, löslichen Stärkesynthasen, Entzweigungsenzymen, Disproportionierungsenzymen, plastidären Stärkephosphorylasen, R1-Enzymen, Amylasen, Glukosidasen, Teilen besagter Nukleotidsequenzen oder mit besagten Nukleotidsequenzen hybridisierende Nukleinsäuremoleküle.
3. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1 oder 2, das ein Desoxyribonukleinsäure-

Molekül ist.

4. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 2, das ein cDNA-Molekül ist.
5. Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 1, das ein Ribonukleinsäure-Molekül ist.
6. Nukleinsäuremolekül, das mit einem Nukleinsäuremolekül einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5 hybridisiert, vorzugsweise spezifisch hybridisiert.
7. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 6.
8. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein Protein mit der Funktion einer löslichen Stärkesynthase III oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.
9. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A oder Teile davon in sense- oder anti-sense-Richtung vorliegt.
10. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleotidsequenz codierend für ein oder mehrere Proteine ausgewählt aus der Gruppe A teilweise in sense-Richtung und teilweise in anti-sense-Richtung vorliegt.
11. Vektor, enthaltend ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß es mit regulatorischen Elementen verknüpft ist, die die Transkription und Synthese einer RNA, die ggf.

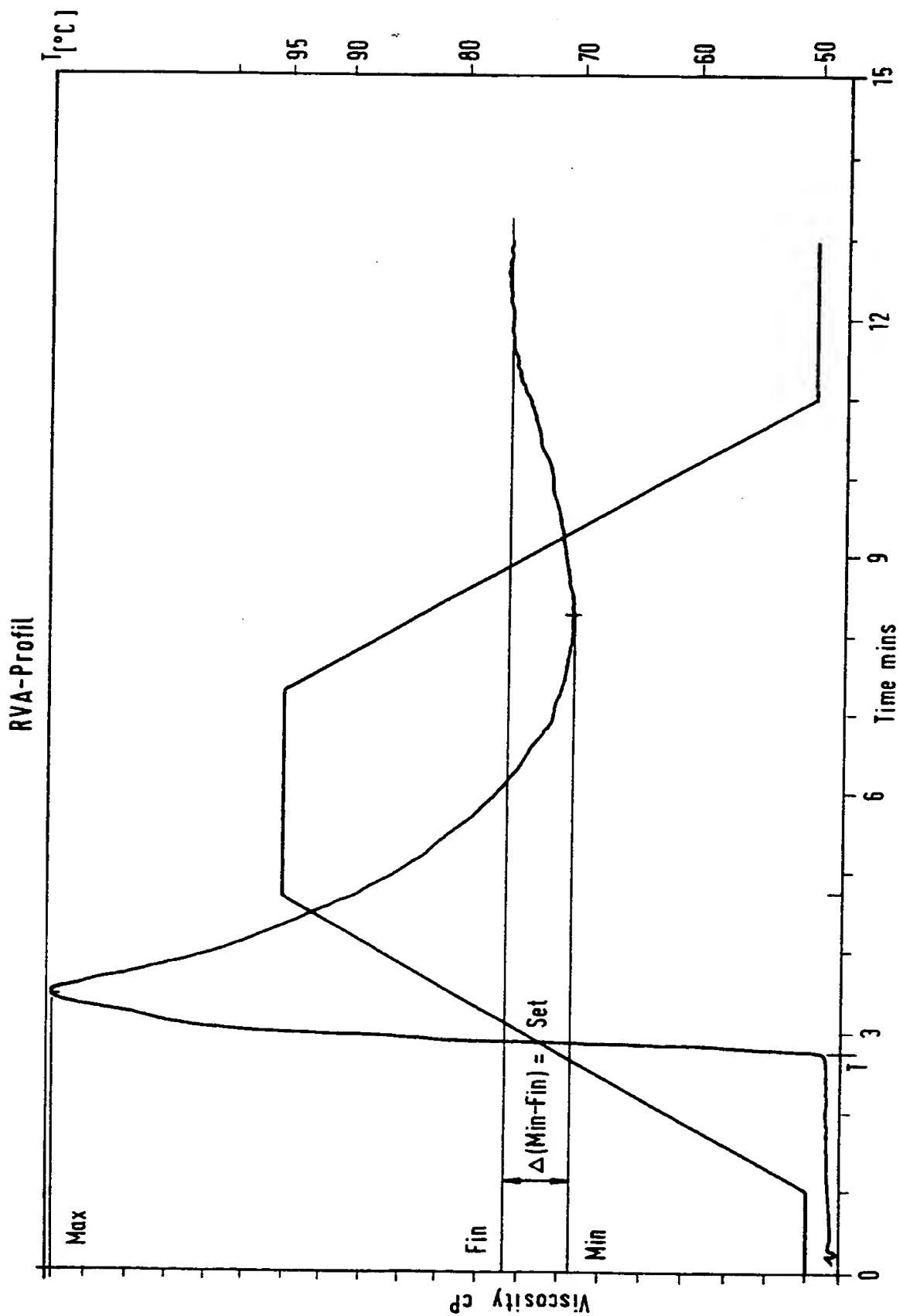


translatierbar ist, in einer pro- oder eukaryontischen Zelle gewährleisten.

12. Wirtszelle, die mit einem Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6 oder einem Vektor nach einem oder mehreren der Ansprüche 7-11 transformiert ist oder von einer solchen Zelle abstammt.
13. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanzenzelle, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß ein Nukleinsäuremolekül nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6, oder ein Vektors nach Anspruch 7-11 in das Genom einer Pflanzenzelle integriert wird.
14. Pflanzenzelle, erhältlich nach einem Verfahren gemäß Anspruch 13.
15. Verfahren zur Herstellung einer transgenen Pflanze, die eine modifizierte Stärke synthetisiert, dadurch gekennzeichnet, daß aus einer Zelle nach Anspruch 14 eine vollständige Pflanze regeneriert wird.
16. Pflanze, enthaltend eine Pflanzenzelle nach Anspruch 14.
17. Pflanze nach Anspruch 16, die eine Nutzpflanze ist.
18. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 17, die eine stärkepeichernde Pflanze ist.
19. Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 18, die eine Weizen-, Mais-, Kartoffel- oder Reispflanze ist.
20. Vermehrungsmaterial einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19.

21. Verfahren zur Herstellung von Stärke nach einem an sich bekannten Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß Pflanzenzellen gemäß Anspruch 14, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 in das Verfahren integriert werden.
22. Stärke, erhältlich aus einer Zelle gemäß Anspruch 12 oder 14, einer Pflanze nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 oder einem Verfahren nach Anspruch 21.
23. Verwendung der Stärke nach Anspruch 22 im industriellen Bereich, vorzugsweise zur Herstellung von Lebensmitteln, Verpackungsmaterialien oder Einwegartikeln.
24. Verwendung von Nukleinsäuremolekülen nach einem oder mehreren der Ansprüche 1-6 oder Vektoren nach einem oder mehreren der Ansprüche 7-11 zur Herstellung von transgenen Zellen, vorzugsweise bakteriellen oder pflanzlichen Zellen.
25. Verwendung von Pflanzenzellen gemäß Anspruch 14, Pflanzen nach einem oder mehreren der Ansprüche 16 bis 19 oder Vermehrungsmaterial nach Anspruch 20 zur Herstellung von Stärke.

1 / 1



**THIS PAGE BLANK (uspto)**

## SEQUENZPROTOKOLL

<110> Hoechst Schering AgrEvo GmbH

<120> Nukleinsäuremoleküle kodierend für eine  $\beta$ -Amylase,  
Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren,  
Verfahren zur Herstellung der Pflanzen, ihre Verwendung  
sowie die modifizierte Stärke

<130> AGR 1998/M 224

<150> DE 19836099.1

<151> 1998-07-31

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1950

<212> DNA

<213> S. tuberosum

<400> 1

```
attaatatta ttattatggc aatgagtctg ccacaccaga tcggtgcctt atcaggaaca 60
tcgctcacgg cggaaaccgg tggagtttca tgcgaagttc cggcgaaggg gagttcagct 120
acatcagcta tgtggagaac accgatgacg aatttaaaaag tatcgggtaca aaaaacagga 180
actgaaattg acagggtgtc gccgtcgccg tcgccgccga tgagtccgat gatgggagga 240
ggaatgcggc cggattttatt agcgtgtcaa gcgttgatgg aagctcaggt agatgaggta 300
gttgagagag aatataaggt taggaattcg tcggagaaaag agaaaggagt tccggtgttt 360
gttatgatgc cggttgatag tgtgaaaatg gatcactactg tgaataggaa gaaggcgatg 420
aatgcbagtt tacaggcgtt gaagagcgcc ggtgtggaag ggattatgat ggatgtgtgg 480
tggggattgg tggagagaga tgcgccggga gagtataatt ggggcgggta tgctgagctt 540
atggaaatgg cgaaaaaaca tggactcaaa gttcaagctg tgatgtcttt ccatcaatgt 600
ggtggaaacg tcggtgattc ctgcacgac cctcttccaa ggtgggttgt tgaggagatg 660
gagaaggatc cagatcttgc atacacagat cagtggggaa ggaggaattt tgaatatgta 720
```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

```

tcgcttggtt gcgatacact tccagttcct aaaggaagga ctctgtcca atgctattct 780
gatttcatga gagggtttag agatagattt gagaatctcc taggtgacac cattgtggaa 840
attcaagtcg ggatgggtcc agctggagag ctccgttata cctcctatcc ggaaaaagat 900
ggagtatgga aattccctgg aattgggtgct ttccagtgtt atgacaagta catgatcagt 960
agcttacagg gtgcagcaga agcttttggg aagcctgaat ggggacacac cggccaacc 1020
gatgctggtc agtacaacaa ttggccagaa gataccaact ttttcaagaa ggaaggtggt 1080
ggatgggata gtcaatatgg ggagttcttc ctacttggg attctgagat gcttttgaac 1140
catggtgaga ggatactgca atcagccaag gcgatattcg aggacaaggg tgttaagatt 1200
tcagttaaga ttgcaggtat tctctggcac tatggaacaa ggtcccatgc ccctgagctg 1260
accgctggat actacaacac ccgtaaccga gatgggttacc ttcccatcgc ccaaagtctt 1320
gcccgccacg gtgcagtttt caacttcaca tgtgttgaga tgcgtgacca cgagcagcca 1380
caagatgcac tatgtgcacc tgagaagttg gttaggcaag tggcttttagc aactcaggaa 1440
gctcaagttc cacttgctgg ggagaatgca ttgccacgat acgatgatta tgcacatgaa 1500
cagatccttc aagcatcctc attgaatata aacgatcaat caggtgatag agagatgtgc 1560
gcgtttacat atttgaggat gaatcctgac ctattccatc ctgataactg gaggcgattc 1620
gttgccttcg tgaagaaaat gaaagaagga aaagacgcaa acaaagtccg ggaacaagta 1680
gagagggagg cagagcattt cgtgcatata actcagccgt tagtgcaaga agctgcagct 1740
gccctcatgc actaagcaaa tggttgtcaa atagtactgt aattttgatc ctttttagcta 1800
acatggagtt tttcaacatg ttacgaggat cttatagctc gttatcgttc ttcttatatg 1860
tttgtaaaac tgtccatcgt gtattttttc gaaggttagac attatgtctt aatgaaatga 1920
tacataattc agtagtaaaa aaaaaaaaaa 1950

```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 579

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; S. tuberosum

&lt;400&gt; 2

```

Met Ala Met Ser Leu Pro His Gln Ile Gly Ala Leu Ser Gly Thr Ser
1           5           10           15

```

```

Leu Thr Ala Glu Thr Gly Gly Val Ser Cys Glu Val Pro Ala Lys Gly
20           25           30

```

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Ser Ser Ala Thr Ser Ala Met Trp Arg Thr Pro Met Thr Asn Leu Lys  
 35 40 45

Val Ser Val Gln Lys Thr Gly Thr Glu Ile Asp Arg Val Ser Pro Ser  
 50 55 60

Pro Ser Pro Pro Met Ser Pro Met Met Gly Gly Gly Met Arg Pro Asp  
 65 70 75 80

Leu Leu Ala Cys Gln Ala Leu Met Glu Ala Gln Val Asp Glu Val Val  
 85 90 95

Glu Arg Glu Tyr Lys Val Arg Asn Ser Ser Glu Lys Glu Lys Gly Val  
 100 105 110

Pro Val Phe Val Met Met Pro Leu Asp Ser Val Lys Met Asp His Thr  
 115 120 125

Val Asn Arg Lys Lys Ala Met Asn Ala Ser Leu Gln Ala Leu Lys Ser  
 130 135 140

Ala Gly Val Glu Gly Ile Met Met Asp Val Trp Trp Gly Leu Val Glu  
 145 150 155 160

Arg Asp Ala Pro Gly Glu Tyr Asn Trp Gly Gly Tyr Ala Glu Leu Met  
 165 170 175

Glu Met Ala Lys Lys His Gly Leu Lys Val Gln Ala Val Met Ser Phe  
 180 185 190

His Gln Cys Gly Gly Asn Val Gly Asp Ser Cys Thr Ile Pro Leu Pro  
 195 200 205

Arg Trp Val Val Glu Glu Met Glu Lys Asp Pro Asp Leu Ala Tyr Thr  
 210 215 220

Asp Gln Trp Gly Arg Arg Asn Phe Glu Tyr Val Ser Leu Gly Cys Asp

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

225		230		235		240									
Thr	Leu	Pro	Val	Leu	Lys	Gly	Arg	Thr	Pro	Val	Gln	Cys	Tyr	Ser	Asp
		245				250								255	
Phe	Met	Arg	Gly	Phe	Arg	Asp	Arg	Phe	Glu	Asn	Leu	Leu	Gly	Asp	Thr
		260						265						270	
Ile	Val	Glu	Ile	Gln	Val	Gly	Met	Gly	Pro	Ala	Gly	Glu	Leu	Arg	Tyr
		275						280						285	
Pro	Ser	Tyr	Pro	Glu	Lys	Asp	Gly	Val	Trp	Lys	Phe	Pro	Gly	Ile	Gly
		290						295						300	
Ala	Phe	Gln	Cys	Tyr	Asp	Lys	Tyr	Met	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Gly	Ala
305						310								315	320
Ala	Glu	Ala	Phe	Gly	Lys	Pro	Glu	Trp	Gly	His	Thr	Gly	Pro	Thr	Asp
						325								330	335
Ala	Gly	Gln	Tyr	Asn	Asn	Trp	Pro	Glu	Asp	Thr	Asn	Phe	Phe	Lys	Lys
						340								345	350
Glu	Gly	Gly	Gly	Trp	Asp	Ser	Gln	Tyr	Gly	Glu	Phe	Phe	Leu	Thr	Trp
						355								360	365
Tyr	Ser	Glu	Met	Leu	Leu	Asn	His	Gly	Glu	Arg	Ile	Leu	Gln	Ser	Ala
						370								375	380
Lys	Ala	Ile	Phe	Glu	Asp	Lys	Gly	Val	Lys	Ile	Ser	Val	Lys	Ile	Ala
385														390	400
Gly	Ile	His	Trp	His	Tyr	Gly	Thr	Arg	Ser	His	Ala	Pro	Glu	Leu	Thr
						405								410	415
Ala	Gly	Tyr	Tyr	Asn	Thr	Arg	Asn	Arg	Asp	Gly	Tyr	Leu	Pro	Ile	Ala

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

420	425	430
Gln Met Leu Ala Arg His Gly Ala Val Phe Asn Phe Thr Cys Val Glu		
435	440	445
Met Arg Asp His Glu Gln Pro Gln Asp Ala Leu Cys Ala Pro Glu Lys		
450	455	460
Leu Val Arg Gln Val Ala Leu Ala Thr Gln Glu Ala Gln Val Pro Leu		
465	470	475 480
Ala Gly Glu Asn Ala Leu Pro Arg Tyr Asp Asp Tyr Ala His Glu Gln		
485	490	495
Ile Leu Gln Ala Ser Ser Leu Asn Ile Asn Asp Gln Ser Gly Asp Arg		
500	505	510
Glu Met Cys Ala Phe Thr Tyr Leu Arg Met Asn Pro Asp Leu Phe His		
515	520	525
Pro Asp Asn Trp Arg Arg Phe Val Ala Phe Val Lys Lys Met Lys Glu		
530	535	540
Gly Lys Asp Ala Asn Lys Cys Arg Glu Gln Val Glu Arg Glu Ala Glu		
545	550	555 560
His Phe Val His Ile Thr Gln Pro Leu Val Gln Glu Ala Ala Ala Ala		
565	570	575
Leu Met His		

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 99/05523

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
See Supplemental Sheet ADDITIONAL MATTER PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

### Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## Continuation of Box I.2

Patent claims 2-4, 6, 7 and 9-25 relate to an excessively large number of possible nucleic acid molecules, methods and plants, of which only a small proportion is supported by the description as defined by PCT Art. 6 and/or can be considered as disclosed in the patent application as defined by PCT Art. 5. In the present case, the patent claims lack the necessary support and the patent application lacks the necessary disclosure to such an extent that a meaningful search covering the entire range of protection sought for appears to be impossible. For this reason, the search was directed towards those parts of the patent claims that appeared to be supported or disclosed as previously defined, namely those parts referring to the nucleic acids, methods and plants as indicated in the embodiment examples 1-12, namely DNA sequences coding for beta-amylase in sense and antisense orientation, optionally combined with DNA sequences coding for soluble starch synthase I, II and/or III in sense and antisense orientation.

The applicant's attention is drawn to the fact that patent claims, or parts of patent claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective whether or not the patent claims are amended following receipt of the International Search Report (PCT Art. 19) or whether or not the applicant files new patent claims during any PCT Chapter II procedure.



# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 99/05523

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9428149	A	08-12-1994	AU 687409 B	26-02-1998
			AU 6947394 A	20-12-1994
			CA 2162383 A	08-12-1994
			CN 1127016 A	17-07-1996
			EP 0701618 A	20-03-1996
			HU 73468 A	28-08-1996
			JP 8510645 T	12-11-1996
			PL 311755 A	18-03-1996
			US 5648249 A	15-07-1997
WO 9205259	A	02-04-1992	AT 175238 T	15-01-1999
			AU 656920 B	23-02-1995
			AU 8651491 A	15-04-1992
			CA 2072656 A	14-03-1992
			DE 69130698 D	11-02-1999
			DE 69130698 T	22-07-1999
			EP 0479359 A	08-04-1992
			JP 5502591 T	13-05-1993
			NZ 239789 A	27-06-1994
			PT 98967 A, B	31-07-1992
			US 5705375 A	06-01-1998
WO 9409144	A	28-04-1994	CA 2146998 A	28-04-1994
			AU 690517 B	30-04-1998
			AU 2696492 A	09-05-1994
			EP 0664835 A	02-08-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. Lionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05523

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/82 C12N9/26 C12N15/54 A01H5/00 C08B30/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N A01H C08B

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	YOSHIDA N ET AL: "A NUCLEAR GENE ENCODING BETA-AMYLASE OF SWEET POTATO" GENE, Bd. 120, Nr. 2, Seite 255-259 XP000616567 ISSN: 0378-1119 das ganze Dokument	1,3-7, 11,12,24
X	DATABASE EMPLN 'Online! EMBL, Heidelberg, Germany AC AJ225087, ID VUA225087, 23. März 1998 (1998-03-23) BHULLAR S S: "Isolation and characterization of beta-amylase from cowpea (Vigna unguiculata)" XP002124966 Zusammenfassung	1,3-7, 11,12,24
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/01/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3018

Bevollmächtigter Bediensteter

Oderwald, H

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In. zionales Aldenzeichen

PCT/EP 99/05523

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	MITA S ET AL.: "Sugar-inducible expression of a gene for beta-amylase in Arabidopsis thaliana" PLANT PHYSIOLOGY, Bd. 107, 1995, Seiten 895-904, XP002124965 das ganze Dokument	1,3-7, 12,24
A	WO 94 28149 A (MONSANTO CO ;BARRY GERARD FRANCIS (US); KISHORE GANESH MURTHY (US)) 8. Dezember 1994 (1994-12-08) das ganze Dokument	2-4,6,7, 9-25
X	ABEL G J W ET AL.: "Cloning and functional analysis of a cDNA encoding a novel 139 kDa starch synthase from potato (Solanum tuberosum L.)" PLANT JOURNAL, Bd. 10, Nr. 6, 1996, Seiten 981-991, XP002121809 das ganze Dokument	6-25
A		2-4
A	WO 92 05259 A (GIST BROCADES NV ;MOGEN INT (NL)) 2. April 1992 (1992-04-02) das ganze Dokument	1-25
A	WO 94 09144 A (ZENECA LTD) 28. April 1994 (1994-04-28) das ganze Dokument	1-25

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
  
2. ☒ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich \_\_\_\_\_  
**Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
  
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
  
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten: \_\_\_\_\_

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 2-4, 6, 7 und 9-25 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Nukleinsäuremoleküle, Verfahren und Pflanzen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art. 5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Nukleinsäuren, Verfahren und Pflanzen wie sie in den Ausführungsbeispielen 1-12 angegeben sind, nämlich beta-Amylase-kodierende DNA-Sequenzen in sense und antisense Orientierung, gegebenenfalls in Kombination mit DNA Sequenzen kodierend für lösliche Stärke-Synthase I, II und/oder III in sense und antisense Orientierung.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int.ionales Aktenzeichen

PCT/EP 99/05523

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9428149 A	08-12-1994	AU 687409 B	26-02-1998
		AU 6947394 A	20-12-1994
		CA 2162383 A	08-12-1994
		CN 1127016 A	17-07-1996
		EP 0701618 A	20-03-1996
		HU 73468 A	28-08-1996
		JP 8510645 T	12-11-1996
		PL 311755 A	18-03-1996
		US 5648249 A	15-07-1997
WO 9205259 A	02-04-1992	AT 175238 T	15-01-1999
		AU 656920 B	23-02-1995
		AU 8651491 A	15-04-1992
		CA 2072656 A	14-03-1992
		DE 69130698 D	11-02-1999
		DE 69130698 T	22-07-1999
		EP 0479359 A	08-04-1992
		JP 5502591 T	13-05-1993
		NZ 239789 A	27-06-1994
		PT 98967 A, B	31-07-1992
		US 5705375 A	06-01-1998
WO 9409144 A	28-04-1994	CA 2146998 A	28-04-1994
		AU 690517 B	30-04-1998
		AU 2696492 A	09-05-1994
		EP 0664835 A	02-08-1995

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

10

Applicant's or agent's file reference 1998/M224PCT	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP99/05523	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 30 July 1999 (30.07.99)	Priority date ( <i>day/month/year</i> ) 31 July 1998 (31.07.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/82		<b>RECEIVED</b> JUL 18 2001 TECH CENTER 1600/2900
Applicant AVENTIS CROPSCIENCE GMBH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

☐ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of \_\_\_\_\_ sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 29 January 2000 (29.01.00)	Date of completion of this report 10 November 2000 (10.11.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

RECEIVED

1997

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05523

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-55, as originally filed,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the claims, Nos. 1-25, as originally filed,  
 Nos. \_\_\_\_\_, as amended under Article 19,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 Nos. \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/1, as originally filed,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the demand,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_,  
 sheets/fig \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/EP99/05523

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 1-25(partially)

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. 1-25(partially)  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

See annex

- ☒ the claims, or said claims Nos. 1-25(partially) are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

- ☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III

3. Impossibility to carry out an examination owing to lack of clarity, lack of support by the description and inadequate disclosure.

1.1 The current Claims 1-25 concern an unreasonably large number of possible nucleic acid molecules, methods and plants, of which only some are supported by the description (PCT Article 6) or can be considered to be adequately disclosed in the application (PCT Article 5).

1.2 In the present case, the claims lack support and the present application lacks adequate disclosure to such an extent that meaningful examination was limited to those parts which appear to be supported and disclosed, namely those nucleic acids, methods and plants indicated in Examples 1-12.

This covers the DNA sequences that code for  $\beta$ -amylase in the sense and antisense directions, recombinant molecules from said sequences and DNA sequences that code for the soluble starch synthases I, II and/or III in the sense and antisense directions.

1.3 The clarity of the claims is crucial because they determine the subject matter for which protection is sought. This is important, since only the European claims are published in all the official languages of the Patent Office, not the description. Consequently, the applicant's

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III

arguments that various unclear or indefinite expressions are defined in the description, and that hence the scope of the claims can remain accordingly broad, are not accepted. As a result of the vague definition of the scope of protection, the claims are considered speculative and inadequate to characterise the invention.

1.4 An independent claim should include all the essential features necessary to characterise the invention in a clear manner. The scope covered by the claims must be as accurate as the invention allows it.

1.5 Moreover, the invention is not adequately disclosed. When the claims cover a broad scope, the description must include a plurality of examples which cover the entire scope of the claims. An application must allow a person skilled in the art to carry out all the configurations of the invention as defined by the broadest claim.

The examples prepared are limited to a few nucleic acids. Consequently, there is no qualified disclosure of the entire nucleic acid molecule as defined in Claims 1 and 2: the broad definitions (which comprise derivatives or parts, specific and non-specific hybridisations, and nucleic acids defined only by functions (!)) do not give instructions which are sufficiently clear to allow a person skilled in the art, in the light of the

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: BOX III

disclosure in the description, to carry out the invention without undue effort or with only a reasonable number of experiments.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement****1. Statement**

Novelty (N)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Inventive step (IS)	Claims		YES
	Claims	1-25	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-25	YES
	Claims		NO

**2. Citations and explanations**

This report makes reference to the following documents:

D1: Yoshida et al., Gene, Vol. 120, No. 2, pages 255-259

D2: Database EMPLN Online EMBL, AC AJ225087, 22 March 1998.

D3: Mita et al., Plant Physiology, Vol. 107, 1995, pages 895-904

D4: Abel et al., Plant Journal, Vol. 10, No. 6, 1996, pages 981-991

D5: WO-A-92/05259.  
the applicant's letter of 25 October 2000.

**2. Novelty (PCT Article 33(2))**

2.1 The present application concerns nucleic acid molecules from potatoes which code for proteins having a  $\beta$ -amylase function, their derivatives or parts therefrom, or nucleic acid molecules that hybridise with said molecules.

2.2 D1 describes the isolation and identification of a nuclear gene that codes for a  $\beta$ -amylase from sweet potatoes.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

As shown by an alignment, the  $\beta$ -amylase of D1 is 48.5% identical to the  $\beta$ -amylase of the present application over a range of 441 amino acids.

2.3 As a result, the subject matter of Claims 1-25 cannot be acknowledged to be novel, since the nucleic acid molecules (and also their parts, derivatives and hybridising nucleic acids) described in these unclearly defined claims are not adequately restricted in relation to the nuclear gene of D1.

2.4 Moreover, it is noted that D2 and D3 also concern the cloning of  $\beta$ -amylases.

D1 describes the cloning of  $\beta$ -amylase from peas showing 59.5% identity over 496 bp. D3 describes in turn the cloning of  $\beta$ -amylase from *Arabidopsis*, which shows 59.9% and 47.5% identity with the claimed DNA and protein sequences, respectively.

2.5 Consequently, the sequences of D2 and D3 are also detrimental to the novelty of the nucleic acids (fragments, derivatives), vectors and host cells as per Claims 1-25.

3. Inventive step (PCT Article 33(3))

3.1 If the subject matter of Claims 1-25 were restricted to the prepared nucleic acids which concern clearly defined sequences (SEQ. ID. No. 1, SEQ. ID. No. 2), an inventive step could be acknowledged.

D1 and D2 or D3 are regarded as the closest prior art.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



- 3.2  $\beta$ -amylases are known from several prior art documents (see the explanations regarding novelty; D1, D2 or D3).
- 3.3 The present nucleic acids differ from those  $\beta$ -amylases described in the prior art in that they were isolated from other organisms.
- 3.4 The invention therefore appears to address the problem of providing additional  $\beta$ -amylases for synthesising modified starch. The object of the claimed nucleic acids, as proposed by the applicant, that is the inhibition of the endogenous production of  $\beta$ -amylase in order to produce modified potato starch, cannot be deduced from the present set of claims.
- 3.5 The cloning of homologous genes concerns a standard method in molecular biology which is straightforward to a person skilled in the art, especially since the advantages achieved thereby are readily foreseeable.

However, as suggested in the letter of response, this type of cloning is complicated by the fact that the already known amylases show less than 60% homology.

Consequently, an inventive step could be acknowledged in the nucleic acids, vectors or host cells as per Claims 1-12 which are supported by the description or considered as sufficiently disclosed, provided the claimed recombinant  $\beta$ -amylases display unexpected effects or properties in comparison with the other enzymes.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

However, the application did not yet indicate such effects or properties.

The same applies to the subject matter of Claims 13-25, which concern uses of said nucleic acids, that is methods for producing transgenic plants, the reproduction materials produced therefrom and their use.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

## ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)  
(max. 12 Zeichen) 1998/M224 NP

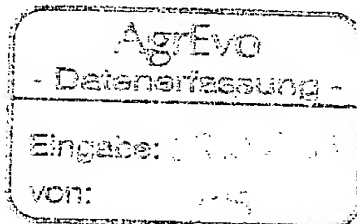
### Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Nukleinsäuremoleküle kodierend für eine  $\beta$ -Amylase, Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, Verfahren zur Herstellung der Pflanzen, ihre Verwendung sowie die modifizierte Stärke

### Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Hoechst Schering AgrEvo GmbH  
Miraustraße 54  
D-13509 Berlin  
Deutschland



☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.: 069-305-82808

Telefaxnr.: 069-305-2200

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

### Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

FROHBERG, Claus  
Blankenhainer Straße 17  
12249 Berlin  
Deutschland

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat): DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:



alle Bestimmungsstaaten



alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika



nur die Vereinigten Staaten von Amerika



die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☐ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

### Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als: ☐ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter.

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Hoechst Schering AgrEvo GmbH  
Patent- und Lizenzabteilung, Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
Deutschland

Telefonnr.: 069-305-82808

Telefaxnr.: 069-305-2200

Fernschreibnr.:

☒ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN**

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

**Regionales Patent**

- ☒ **AP ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SL Sierra Leone, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☒ **EA Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidschan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **EP Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ **OA OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, GW Guinea-Bissau, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben) .....

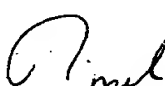

**Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):**

- |   |  |
|---|--|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> Vereinigte Arabische Emirate            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia                              |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albanien .....                          | <input type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho .....                                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Armenien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Litauen                              |
| <input type="checkbox"/> <b>AT</b> Österreich .....                                   | <input type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxemburg                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australien .....                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Lettland                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Aserbaidschan                           | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> Republik Moldau .....                |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnien-Herzegowina .....               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagaskar .....                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbados                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> Die ehemalige jugoslawische Republik |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgarien .....                         | Mazedonien .....   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brasilien .....                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolei                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Belarus .....                           | <input type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Kanada                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexiko .....                         |
| <input type="checkbox"/> <b>CH und LI</b> Schweiz und Liechtenstein                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norwegen                             |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> China .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> Neuseeland .....                     |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Kuba .....                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Polen .....                          |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> Tschechische Republik .....             | <input type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal .....                                  |
| <input type="checkbox"/> <b>DE</b> Deutschland .....                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Rumänien                             |
| <input type="checkbox"/> <b>DK</b> Dänemark .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Russische Föderation .....           |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estland .....                           | <input type="checkbox"/> <b>SD</b> Sudan   |
| <input type="checkbox"/> <b>ES</b> Spanien .....                                      | <input type="checkbox"/> <b>SE</b> Schweden  |
| <input type="checkbox"/> <b>FI</b> Finnland .....                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapur                             |
| <input type="checkbox"/> <b>GB</b> Vereinigtes Königreich                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slowenien .....                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenada                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slowakei .....                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Georgien .....                          | <input type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone .....                              |
| <input type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tadschikistan .....                  |
| <input type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambia   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkmenistan .....                   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Kroatien .....                          | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Türkei .....                         |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Ungarn .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinidad und Tobago .....            |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonesien                              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine .....                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israel .....                            | <input type="checkbox"/> <b>UG</b> Uganda .....                                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> Indien .....                            | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> Vereinigte Staaten von Amerika ..... |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Island                                  | .....  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japan .....                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Usbekistan .....                     |
| <input type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenia .....  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Vietnam .....                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kirgisistan                             | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Jugoslawien .....                    |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> Demokratische Volksrepublik Korea ..... | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> Südafrika .....                      |
| .....   | <input type="checkbox"/> <b>ZW</b> Simbabwe .....                                  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> Republik Korea                          | Kästchen für die Bestimmung von Staaten, die dem PCT nach der                      |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kasachstan .....                        | Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Saint Lucia                             | <input type="checkbox"/> <b>.CR</b> Costa Rica .....                               |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                               | <input type="checkbox"/> <b>.DM</b> Dominica .....                                 |

**Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen:** Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



<b>Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH</b>		<input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben.		
Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat)	Aktenzeichen der früheren Anmeldung	Ist die frühere Anmeldung eine:		
		national Anmeldung: Staat	regionale Anmeldung:* regionales Amt	internationale Anmeldung: Anmeldeamt
Zeile (1) 31. Juli 1998 31.07.98	19836099.1	DE		
Zeile (2)				
Zeile (3)				
<input type="checkbox"/> Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) _____ bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist) * Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.				
<b>Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE</b>				
Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden)		Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche; Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): Datum (Tag/Monat/Jahr)      Aktenzeichen      Staat (oder regionales Amt)		
ISA /				
<b>Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE</b>				
Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern:		Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:		
Antrag : 3		1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung		
Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 55		2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht		
Ansprüche : 4		3. <input checked="" type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): 36963		
Zusammenfassung : 1		4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift		
Zeichnungen : 1		5. <input checked="" type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet:		
Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 5		6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache:		
Blattzahl insgesamt : 69		7. <input checked="" type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material		
Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.):		8. <input checked="" type="checkbox"/> Sequenzprotokolle für Nucleotide und/oder Aminosäuren in computerlesbarer Form		
		9. <input type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten):		
		Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: DE		
<b>Feld Nr. IX UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS</b>				
Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.				
 Dr. Hans Christoph Rippel (AV-Nr. 36963)		 Dr. Claus Froberg		

Vom Anmeldeamt auszufüllen	
1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung:	2. Zeichnungen <input type="checkbox"/> eingegangen:  <input type="checkbox"/> nicht eingegangen:
3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung:	
4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT:	
5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): ISA /	6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben

Vom Internationalen Büro auszufüllen
Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PATENT COOPERATION TREATY

WO 00/08185  
PCT/EP99/05523

**PCT**

## NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

HOECHST SCHERING AGREVO GMBH  
Patent- und Lizenzabteilung  
Gebäude K 801  
D-65926 Frankfurt am Main  
ALLEMAGNE

Hoechst Schering Agrevo GmbH
Patent- u. Lizenzabteilung K 801
Vorg.
Eing. 25. FEB. 2000
OWV
Gef. 25. FEB. 2000

Agrevo
- Patentanmeldung -
Eingabe: 25.02.00

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 17 February 2000 (17.02.00)		
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 1998/M224NP		
<b>International application No.</b> PCT/EP99/05523	<b>International filing date (day/month/year)</b> 30 July 1999 (30.07.99)	<b>Priority date (day/month/year)</b> 31 July 1998 (31.07.98)
<b>Applicant</b> HOECHST SCHERING AGREVO GMBH et al		

### IMPORTANT NOTICE

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:  
 AU,CN,EP,IL,JP,KP,KR,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:

AE,AL,AM,AP,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CU,CZ,EA,EE,GD,GE,HR,HU,ID,IN,IS,KG,KZ,LC,LK,LR,  
 LT,LV,MD,MG,MK,MN,MX,NO,NZ,OA,PL,RO,RU,SG,SI,SK,TJ,TM,TR,TT,UA,UZ,VN,YU,ZA

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 17 February 2000 (17.02.00) under No. WO 00/08185

### REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

### REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Authorized officer  <div style="text-align: right;">J. Zahra</div>  Telephone No. (41-22) 338.83.38
--	---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Continuation of Form PCT/IB/308

**NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF  
THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES**

<b>Date of mailing (day/month/year)</b> 17 February 2000 (17.02.00)	<b>IMPORTANT NOTICE</b>
<b>Applicant's or agent's file reference</b> 1998/M224NP	<b>International application No.</b> PCT/EP99/05523
<p>The applicant is hereby notified that, at the time of establishment of this Notice, the time limit under Rule 46.1 for making amendments under Article 19 has not yet expired and the International Bureau had received neither such amendments nor a declaration that the applicant does not wish to make amendments.</p>	

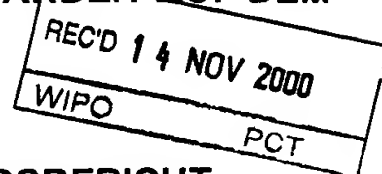
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

## PCT

### INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)



T 16



Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 1998/M224PCT	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP99/05523	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 30/07/1999	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 31/07/1998
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/82		
Anmelder AVENTIS CROPS SCIENCE GMBH et al.		

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 8 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
  - ☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags  29/01/2000	Datum der Fertigstellung dieses Berichts  10.11.2000
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:   Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter  Novak, S  Tel. Nr. +49 89 2399 8930 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**I. Grundlage des Berichts**

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

**Beschreibung, Seiten:**

1-55                      ursprüngliche Fassung

**Patentansprüche, Nr.:**

1-25                      ursprüngliche Fassung

**Zeichnungen, Blätter:**

1/1                        ursprüngliche Fassung

2. Hinsichtlich der **Sprache**: Alle vorstehend genannten Bestandteile standen der Behörde in der Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht worden ist, zur Verfügung oder wurden in dieser eingereicht, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

Die Bestandteile standen Behörde in der Sprache: , zur Verfügung bzw. wurden in dieser Sprache eingereicht; dabei handelt es sich um

- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen Recherche eingereicht worden ist (nach Regel 23.1(b)).
- ☐ die Veröffentlichungssprache der internationalen Anmeldung (nach Regel 48.3(b)).
- ☐ die Sprache der Übersetzung, die für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung eingereicht worden ist (nach Regel 55.2 und/oder 55.3).

3. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das:

- ☐ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.
- ☐ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.
- ☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.
- ☐ Die Erklärung, dass das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.
- ☐ Die Erklärung, dass die in computerlesbarer Form erfassten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

4. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

- ☐ Beschreibung,      Seiten:  
☐ Ansprüche,      Nr.:  
☐ Zeichnungen,      Blatt:

5. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)).

*(Auf Ersatzblätter, die solche Änderungen enthalten, ist unter Punkt 1 hinzuweisen; sie sind diesem Bericht beizufügen).*

6. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

**III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit**

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.  
☒ Ansprüche Nr. 1 - 25 (partially).

**Begründung:**

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. 1 - 25 (partially) sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):  
siehe Beiblatt
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 1 - 25 (partially) sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.
2. Eine sinnvolle internationale vorläufige Prüfung kann nicht durchgeführt werden, weil das Protokoll der Nukleotid- und/oder Aminosäuresequenzen nicht dem in Anlage C der Verwaltungsvorschriften vorgeschriebenen Standard entspricht:
- ☐ Die schriftliche Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.
- ☐ Die computerlesbare Form wurde nicht eingereicht bzw. entspricht nicht dem Standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung**

**1. Feststellung**

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1 - 25
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	
	Nein: Ansprüche	1 - 25
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1 - 25
	Nein: Ansprüche	

**2. Unterlagen und Erklärungen  
siehe Beiblatt**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

- D1 = Yoshida et al., Gene, Bd. 120, Nr. 2, Seiten 255-259
- D2 = Database EMPLN Online EMBL, AC AJ225087, 22. März 1998
- D3 = Mita et al., Plant Physiology, Bd. 107, 1995, Seiten 895-904
- D4 = Abel et al., Plant Journal, Bd. 10, Nr. 6, 1996, Seiten 981-991
- D5 = WO92 05259 A

Auf Ihr Schreiben vom 25. 10. 2000

ad III.

3. Unprüfbarkeit mangels Klarheit, mangelnder Stützung durch die Beschreibung, und mangelnder Offenbarung
- 1.1. Die geltenden Patentansprüche 1 - 25 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig grosse Zahl möglicher Nukleinsäuremoleküle, Verfahren und Pflanzen, von denen sich nur ein kleiner Teil im Sinne von Artikel 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder im Sinne von Artikel 5 PCT in der Patentanmeldung als offenbart gelten können.
- 1.2. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der gegenwärtigen Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Masse, daß eine sinnvolle Prüfung auf jene Teile beschränkt wurde, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich jene Nukleinsäuren, Verfahren und Pflanzen wie sie in den Ausführungsbeispielen 1 - 12 angegeben sind.  
Darunter fallen die  $\beta$ -Amylase kodierenden DNA-Sequenzen in sense und antisense Orientierung, bzw. rekombinante Moleküle aus besagten Sequenzen und DNA Sequenzen die für lösliche Stärke-Synthase I, II, und/oder II in sense und antisense Orientierung kodieren.
- 1.3. Die Klarheit der Patentansprüche ist von größter Bedeutung, da sie den Gegenstand bestimmen für den Schutz gesucht wird. Dies ist wichtig, da nur die europäischen Patentansprüche, nicht aber die Beschreibung, in allen

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Amtssprachen des Patentamts veröffentlicht werden.

Daher wir den Argumenten der Anmelderin nicht zugestimmt, daß diverse unklare, bzw. unpräzise Ausdrücke ihre Definition in der Beschreibung finden, und somit der Umfang der Ansprüche entsprechend breit gehalten werden kann.

Durch die vage Definition des Schutzzumfangs werden die Ansprüche als spekulativ betrachtet, und als nicht ausreichend um die Erfindung zu charakterisieren.

- 1.4. In einem unabhängigen Patentanspruch sind alle wesentlichen Merkmale, die zur Angabe der Erfindung notwendig sind, deutlich auszuführen. Der durch die Patentansprüche angegebene Bereich muß so präzise sein, wie es die Erfindung zuläßt.
- 1.5. Außerdem ist die Erfindung nicht ausreichend offenbart. Wo die Ansprüche einen breiten Bereich abdecken, muß die Beschreibung mehrere Beispiele anführen, die das gesamte Ausmaß der Ansprüche abdeckt. Eine Patentanmeldung muß es dem Fachmann erlauben jede Ausführung der Erfindung, wie vom breitesten Anspruch definiert, nachzuvollziehen.  
Die ausgearbeiteten Beispiele sind auf einige wenige Nukleinsäuren beschränkt. Es gibt daher keine befähigte Offenbarung für die gesamten Nukleinsäuremoleküle wie von Ansprüchen 1 und 2 definiert: die breiten Definitionen (welche Derivate, oder Teile umfassen, bzw. spezifische, wie auch unspezifische Hybridisierungen, sowie Nukleinsäuren die rein nach Funktionen(!) definiert sind) geben keine genügend klaren Instruktionen für den Fachmann, im Lichte ihrer Offenbarung durch die Beschreibung, um sie ohne ungebührenden Aufwand, bzw. mit einer vernünftigen Anzahl an Experimenten, in die Praxis umzusetzen.

ad V.

## 2. Neuheit (Artikel 33(2) PCT)

- 2.1. Die gegenwärtige Anmeldung befaßt sich mit Nukleinsäuremolekülen aus Kartoffeln, die für Proteine mit der Funktion einer  $\beta$ -Amylase kodieren, deren Derivate, bzw. Teile davon, oder daran hybridisierende Nukleinsäuremoleküle.

**THIS PAGE BLANK (uspto)**

- 2.2. D1 beschreibt die Isolierung und Charakterisierung eines nukleären Gens das eine  $\beta$ -Amylase der Süßkartoffel kodiert.  
In einem Alignment zeigt die  $\beta$ -Amylase aus D1 48.5% Identität über einen Bereich von 441 Aminosäuren mit der  $\beta$ -Amylase der gegenwärtigen Anmeldung.
- 2.3. Daraus folgt, daß für den Gegenstand von Ansprüchen 1 - 25 keine Neuheit anerkannt werden kann, da die in diesen unklar definierten Ansprüchen beschriebenen Nukleinsäuremoleküle (v.a. Teile, Derivate, bzw. hybridisierende Nukleinsäuren) nicht ausreichend von dem nukleären Gen aus D1 abgegrenzt sind.
- 2.4. Ferner wird darauf hingewiesen daß sich auch D2 und D3 mit der Klonierung von  $\beta$ -Amylasen befassen.  
D2 beschreibt die Klonierung von  $\beta$ -Amylase aus der Erbse, welche 59.5% Identität über 496bp aufweist, D3 wiederum die Klonierung von  $\beta$ -Amylase aus Arabidopsis, welche 59.9% bzw. 47.5% Identität mit den beanspruchten DNA- bzw. Proteinsequenzen aufweist.
- 2.5. Damit stehen auch die Sequenzen aus D2 und D3 den Nukleinsäuren (Fragmenten, Derivaten), bzw. Vektoren oder Wirtszellen von Ansprüchen 1 - 25 neuheitsschädlich gegenüber.
3. Erfinderische Tätigkeit (Artikel 33(3) PCT)
- 3.1. Wenn der Gegenstand von Ansprüchen 1 - 25 auf jene ausgearbeiteten Nukleinsäuren beschränkt wäre, die sich auf eindeutig definierte Sequenzen (SEQ ID. No. 1, SEQ ID No. 2) beziehen, könnte eine erfinderische Tätigkeit anerkannt werden.  
D1 bzw. D2 oder D3 wird als nächster Stand der Technik erachtet.
- 3.2.  $\beta$ -Amylasen sind vom Stand der Technik aus mehreren Dokumenten bekannt (siehe unter Neuheit; D1, D2, oder D3).
- 3.3. Von diesen im Stand der Technik beschriebenen  $\beta$ -Amylasen unterscheiden sich die vorliegenden Nukleinsäuren darin, daß sie aus anderen Organismen isoliert

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

wurden.

3.4. Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe scheint daher darin zu liegen, zusätzliche  $\beta$ -Amylasen zu Verfügung zu stellen, um modifizierte Stärke zu synthetisieren. Die von der Anmelderin vorgeschlagene Aufgabe der beanspruchten Nukleinsäuren (Inhibierung der endogenen Produktion von  $\beta$ -Amylase um modifizierte Kartoffelstärke herzustellen), kann aus dem gegenwärtigen Anspruchssatz nicht herausgelesen werden.

3.5. Die Klonierung von homologen Genen betrifft eine in der Molekularbiologie übliche Standardmethode, die im Rahmen dessen liegt, was ein Fachmann aufgrund der ihm geläufigen Überlegungen zu tun pflegt, zumal die damit erreichten Vorteile ohne weiteres abzusehen sind.  
Dennoch wird, wie im Antwortschreiben nahegelegt, jene Klonierung dadurch erschwert da die bereits bekannten Amylasen einen Homologiegrad von geringer als 60% aufweisen.  
Daher könnte für die in der Beschreibung gestützten bzw. als offenbart geltenden Nukleinsäuren, bzw. Vektoren, oder Wirtszellen des Anspruchs 1 - 12 erfinderische Tätigkeit anerkannt werden, sobald die beanspruchten rekombinanten  $\beta$ -Amylasen unerwartete Wirkungen oder Eigenschaften gegenüber den anderen Enzymen aufweist.  
Derartige Wirkungen oder Eigenschaften sind jedoch in der Anmeldung bislang nicht angegeben.

Dasselbe gilt für den Gegenstand von Ansprüchen 13 - 25, der mit Anwendungen solcher Nukleinsäuren, i.e. Verfahren zur Herstellung transgener Pflanzen, bzw. daraus resultierender Vermehrungsmaterialien, und deren Nutzung befaßt ist.

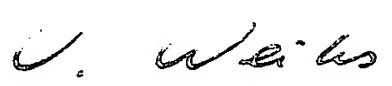
**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

Hoechst Schering  
AgrEvo GmbH  
  
65926 Frankfurt am Main

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT  
issued pursuant to Rule 7.1 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:  St- $\beta$ -Amy	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  DSM 12348
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I. above was accompanied by:  <input type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation  (Mark with a cross where applicable).	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I. above, which was received by it on 1998-07-24 (Date of the original deposit) <sup>1</sup> .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH  Address: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):    Date: 1998-07-30

<sup>1</sup> Where Rule 6.4 (d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



M.H

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT  
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts <b>1998/M224NP</b>	<b>WEITERES VORGEHEN</b> siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen <b>PCT/EP 99/ 05523</b>	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) <b>30/07/1999</b>	(Früheste) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) <b>31/07/1998</b>
Anmelder <b>HOECHST SCHERING AGREVO GMBH et al.</b>		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz ist die Internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☐ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☒ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

**NUKLEINSÄREMOLUKÜLE KODIEREND FÜR BETA-AMYLASE, PFLANZEN, DIE EINE MODIFIZIERTE  
STÄRKE SYNTHETISIEREN, HERSTELLUNGSVERFAHREN UND VERWENDUNGEN**

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 1

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.



**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Teile der Internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
**Siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210**
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Fortsetzung von Feld I.2

Die geltenden Patentansprüche 2-4, 6, 7 und 9-25 beziehen sich auf eine unverhältnismäßig große Zahl möglicher Nukleinsäuremoleküle, Verfahren und Pflanzen, von denen sich nur ein kleiner Anteil im Sinne von Art. 6 PCT auf die Beschreibung stützen und/oder als im Sinne von Art.5 PCT in der Patentanmeldung offenbart gelten kann. Im vorliegenden Fall fehlt den Patentansprüchen die entsprechende Stütze und fehlt der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als gestützt und offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend, die Nukleinsäuren, Verfahren und Pflanzen wie sie in den Ausführungsbeispielen 1-12 angegeben sind, nämlich beta-Amylase-kodierende DNA-Sequenzen in sense und antisense Orientierung, gegebenenfalls in Kombination mit DNA Sequenzen kodierend für lösliche Stärke-Synthase I, II und/oder III in sense und antisense Orientierung.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

GB 9201881  
SA 65439

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.  
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on  
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 28/06/93

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9211382	09-07-92	EP-A- 0542929	26-05-93
WO-A-9214827	03-09-92	DE-A- 4104782 AU-A- 1226592	20-08-92 15-09-92
WO-A-9119806	26-12-91	AU-A- 8220291 EP-A- 0536293	07-01-92 14-04-93
EP-A-0372358	13-06-90	US-A- 5004864 AU-B- 625542 AU-A- 4561689	02-04-91 16-07-92 31-05-90
WO-A-9309237	13-05-93	None	

EPO FORM P007

For more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/GB 92/01881

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category °	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No.
X	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS vol. 89  , 1990, Philadelphia, PA, US;  abstract no. 48351,  DANG, P.L., ET AL. 'Comparison of soluble  starch synthases and branching enzymes  from leaves and kernels of normal and  amylose-extender maize'  see abstract  &amp; BIOCHEM. GENET.  vol. 27, no. 9/10, 1989,  pages 521 - 532</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,3,5,6,  11,14,  16,17,  19,21,  23,24,  29,32,33</p> <p>38-40</p>
A	<p>PLANT PHYSIOLOGY.  vol. 99, no. 1, May 1992, ROCKVILLE, MD,  USA.  page 87  FISHER, D.K., ET AL. 'Cloning and  characterization of cDNAs for starch  branching enzyme in Zea mays L.'  see abstract 519</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>6,11</p>
A	<p>PLANT PHYSIOLOGY. SUPPL.  vol. 99, no. 1, May 1992, ROCKVILLE, MD,  USA.  page 22  MA, S., ET AL. 'Soluble starch synthase  from sweet corn'  see abstract 131</p> <p style="text-align: center;">---</p>	<p>1,11</p>
E	<p>WO,A,9 309 237 (SANDOZ)  13 May 1993</p> <p>see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	<p>1,5,6,  13,  15-17,  19,23,  24,31-33</p>